

Patrícia Alves Fernandes

# Estudo de derivados da lomefloxacina em condições fisiológicas



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
SETEMBRO/2012

Patrícia Alves Fernandes

# Estudo de derivados da lomefloxacinina em condições fisiológicas



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
SETEMBRO/2012

# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pela sua presença, paciência e força., aos meus irmãos pelo apoio sempre incondicional e ajuda em todos os momentos da minha vida, ao meu namorado, pelo apoio, paciência, presença e pela calma que me transmite diariamente.

Aos meus amigos que me ouvem e me aturam, mesmo quando se torna difícil!

À Mariana, ao Raúl e à Isabel pela disponibilidade, ajuda, e por todo o apoio ao longo de todo o ano.

Por último, um agradecimento muito especial à Dr<sup>a</sup> Paula Gameiro e Dr<sup>a</sup> Maria José Feio, por todo o apoio, disponibilidade, paciência e ajuda.

## Resumo:

Uma das principais consequências do uso indiscriminado de antibióticos, é a sua perda de atividade face a algumas infeções bacterianas. Uma das estratégias para combater essa resistência será o “design” de novos fármacos (antibióticos), cuja atividade seja substancialmente melhorada nas condições fisiológicas, ou seja, o estudo em solução, das diferentes espécies, que podem existir/coexistir a pH fisiológico, e que podem promover a referida atividade biológica.

A interação da lomefloxacina (Lmx) com o catião cobre (II) foi estudada em solução, e as respetivas constantes de estabilidade dos complexos (binário e ternário) foram determinadas por potenciometria. Saliente-se que os valores das mesmas foram substancialmente mais elevados para o caso do complexo ternário (Cu(II):Lmx:Phe) comparativamente ao complexo binário (Cu(II):Lmx). Na análise dos diagramas de distribuição, observa-se que, tanto o complexo de cobre binário, como o ternário, são as espécies maioritárias em solução, ao pH fisiológico ( $\approx 7,4$ ), no entanto, apenas o complexo ternário é estável nas concentrações e pH fisiológicos (em simultâneo). Os estudos microbiológicos foram então realizados com soluções de Lmx e de Complexo ternário, usando-se estirpes mutantes de, *Escherichia (E.) coli*, com estas concluiu-se que tanto a Lmx como o complexo exibem actividade anti-bacteriana e não parecem ter grande dependência das porinas da membrana externa bacteriana (OmpC e OmpF), no entanto, o complexo ternário, parece evidenciar alguma vantagem em relação à Lmx para uma das estirpes. O estudo espectral destes dois antibióticos parece confirmar a fotossensibilidade da Lmx, que parece diminuir quando complexada com Cu (II).

## Abstract:

One of the main consequences of the indiscriminate use antibiotics, is its lack of activity against some bacterial infections. One strategy to counter this resistance will be the "design" of new drugs (antibiotics), whose activity is enhanced in physiological conditions, that is, the study in solution of the various species which can exist / coexist at physiological pH, that can promote biological activity

The interaction of lomefloxacin (Lmx) with the cation copper (II) was studied in solution and the stability constants of the complexes were determined by potentiometry. It should be noted that the values of the stability constants were substantially higher for the case of ternary complex (Cu (II):Lmx: Phe) compared to binary complex (Cu (II):Lmx). Through the analysis of the distribution diagrams, it is observed that both copper complexes (binary and ternary) are the main species in solution at physiological pH ( $\approx 7.4$ ), however, only the ternary complex is stable at physiological concentrations and pH. Microbiological studies were then conducted with solutions Lmx and ternary complex, using mutant strains of *Escherichia (E.) coli* K12 with these concluded that both Lmx as complex showed biological activity and does not appear to have great dependence on the OmpC and OmpF (porins of outer membrane in Gram-negative bacteria), however, the ternary complex seem to show any advantage over Lmx for one of the mutant strains. The spectroscopic study of these two antibiotics seems to confirm the photosensitivity of Lmx, which seems to decrease when complexed with Cu (II).

## Résumé:

L'une des principales conséquences de l'utilisation des antibiotiques sans limites, est la diminution de sa activité contre certaines infections bactériennes. Une stratégie pour contrer cette résistance sera la conception de nouveaux médicaments (antibiotiques), dont l'activité est sensiblement améliorée dans des conditions physiologiques, c'est à dire, l'étude en solution des diverses espèces qui peuvent exister / coexister au pH physiologique, ce qui peut favoriser l'activité biologique

L'interaction de lomefloxacin avec le Cu (II) en solution a été étudiée et les constantes de stabilité des complexes ont été déterminés par potentiométrie. Il convient de noter que les valeurs de celles-ci étaient nettement plus élevés dans le cas d'un complexe ternaire (Cu (II):Lmx:Phe) par rapport au complexe binaire (Cu (II):Lmx). Dans l'analyse de les diagrammes de distribution, on constate que les complexes binaire et ternaire de cuivre, sont des espèces majoritaires en solution à pH physiologique ( $\approx 7,4$ ), cependant, seul le complexe ternaire est stable à concentrations et pH physiologiques simultanément. Les études microbiologiques ont été réalisées avec des solutions de Lmx et complexe ternaire; pour cela des souches mutantes de *Escherichia (E.) Coli K12* ont été utilisées. Les résultats montrent que les deux antibiotiques (Lmx et complexe ternaire) possèdent activité antibactérienne qui ne semble pas avoir une grande dépendance sur l'OmpF et l'OmpC porines dans les membranes bactériennes., cependant, le complexe ternaire semblent montrer un avantage sur Lmx pour l'une des souches mutantes. L'étude spectroscopique de ces deux antibiotiques semble confirmer la photosensibilité de Lmx, qui diminue lorsqu'il est complexé avec Cu (II).

# Índice

Agradecimentos .....	III
Resumo: .....	IV
Abstract: .....	V
Résumé: .....	VI
Índice .....	VII
Índice de Figuras .....	X
Índice de Tabelas .....	XII
1 Introdução teórica .....	1
1.1 Das quinolonas às fluoroquinolonas .....	2
1.2 As fluoroquinolonas .....	4
1.2.1 Propriedades físico-químicas .....	4
1.2.1.1 pH e grau de ionização .....	4
1.2.1.2 Complexação com cátions metálicos .....	5
1.2.2 Lomefloxacin .....	7
1.2.2.1 Relações estrutura-atividade .....	7
1.2.3 Mecanismo de ação .....	8
1.2.4 Mecanismos de resistência microbiana .....	8
1.2.4.1 Mecanismos de resistência microbiana a fluoroquinolonas .....	9
1.3 Estrutura bacteriana .....	10
1.3.1 Gram-negativas versus Gram-positivas .....	10
1.3.2 Membrana externa de bactérias Gram-negativas .....	10
1.3.2.1 Porinas .....	12
1.3.2.1.1 OmpC e OmpF .....	12
2 Metodologia .....	14
2.1 Potenciometria .....	15
2.1.1 Reagentes e instrumentação .....	15

2.1.2	Soluções .....	15
2.1.3	Titulações potenciométricas .....	16
2.1.4	Sistema potenciométrico .....	16
2.1.5	Calibração do sistema .....	17
2.1.6	Método de Gran .....	17
2.1.7	Programas para tratamento de resultados .....	17
2.1.8	Determinação das constantes de acidez, associação e estabilidade .....	18
2.2	Ensaio microbiológico .....	19
2.2.1	Soluções de agentes antimicrobianos .....	19
2.2.1.1	Lomefloxacin .....	19
2.2.1.2	Complexo ternário .....	19
2.2.2	Estirpes utilizadas .....	20
2.2.3	Meios de cultura .....	21
2.2.4	Preparação de inóculo bacteriano .....	21
2.2.5	Determinação da concentração inibitória mínima .....	21
2.2.6	Diluição em placa .....	22
2.2.6.1	Microdiluição do agente antimicrobiano .....	22
2.2.6.2	Adição do agente microbiano .....	22
2.2.7	Incubação das placas .....	22
2.2.8	Leitura e interpretação dos resultados .....	23
2.3	Estudos espectroscópicos .....	24
2.3.1	Soluções e instrumentação .....	24
2.3.1.1	UV-Vis .....	24
2.3.1.2	Fluorimetria .....	24
3	Resultados e discussão .....	25
3.1	Potenciometria .....	26
3.1.1	Titulações potenciométricas .....	26
3.1.2	Determinação das constantes de acidez da lomefloxacin .....	26
3.1.3	Determinação de constantes de estabilidade .....	27
3.1.3.1	Sistemas binários .....	27



3.1.3.1.1	Complexos de cobre (II) .....	27
3.1.3.1.2	Sistema Lmx:Phe.....	29
3.1.3.2	Sistema ternário .....	31
3.1.4	Diagramas de distribuição de espécies.....	32
3.1.4.1	Concentrações não fisiológicas.....	33
3.1.4.1.1	Lomefloxaxina (Lmx).....	33
3.1.4.1.2	Sistema binário (Cu:Lmx) 1:2.....	34
3.1.4.1.3	Sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) 1:1:1 .....	35
3.1.4.2	Concentrações fisiológicas .....	35
3.1.4.2.1	Sistema binário (Cu:Lmx) 1:2.....	36
3.1.4.2.2	Sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) 1:1:1 .....	37
3.1.5	Estudos microbiológicos .....	37
3.1.5.1	Concentração inibitória mínima (MIC) para as estirpes testadas.....	37
3.2	Estudos espectroscópicos .....	39
3.2.1	Leis de Lambert-Beer .....	39
3.2.1.1	Lomefloxacina .....	40
3.2.1.2	Complexo ternário .....	40
3.2.2	Influência da radiação UV nos espectros dos antibióticos.....	41
3.2.2.1	Espetroscopia UV-Vis.....	41
3.2.2.1.1	Lomefloxacina.....	41
3.2.2.1.2	Complexo ternário.....	42
3.2.2.2	Fluorimetria .....	43
3.2.2.2.1	Lomefloxacina.....	43
3.2.2.2.2	Complexo ternário.....	45
4	Conclusão.....	47
5	Bibliografia.....	49

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1-</b> Estrutura base das quinolonas (adaptada de [3] ) .....	2
<b>Figura 1.2-</b> Estrutura base das fluoroquinolonas (adaptada de [3] ) .....	2
<b>Figura 1.3-</b> Mecanismo de ionização de uma fluoroquinolona (ciprofloxacina).....	4
<b>Figura 1.4-</b> Estruturas das fluoroquinolonas ciprofloxacina (A) e enrofloxacin (B) .....	5
<b>Figura 1.5 -</b> Modos de coordenação do grupo carboxílico ao metal[12] .....	6
<b>Figura 1.6-</b> Estrutura química da 1,10-fenantrolina (adaptada de <i>www.chemicaland21.com</i> <i>consultada em 26/09/12</i> ).....	6
<b>Figura 1.7-</b> Estrutura química da lomefloxacina ( adaptada de [3] ) .....	7
<b>Figura 1.8-</b> Diferentes mecanismos de resistência bacteriana (adaptada de <i>http://www.britannica.com/</i> , página consultada a 14/09/12).....	9
<b>Figura 1.9-</b> Parede celular e membrana externa das bactérias Gram-negativas (adaptada de [2]). .....	11
<b>Figura 1.10-</b> Representação simplificada da porinas OmpC (A) e OmpF (B)– visão da unidade monomérica de lado (em baixo) e visão de topo do homotrímero ( adaptada de <i>http://www.grin.com/en/doc/243402/mutational-analysis-of-the-proteins-btub-and-tonb-their-roles-in-</i> <i>cobalamin- consultada a 16/09/12</i> ) .....	13
<b>Figura 2.1-</b> Hyperquad 2008 .....	17
<b>Figura 2.2-</b> HySS .....	17
<b>Figura 2.3-</b> Câmara de fluxo laminar usada .....	19
<b>Figura 2.4-</b> Provável estrutura do complexo ternários. ....	20
<b>Figura 2.5-</b> Placa exemplificativa para determinação da concentração inibitória mínima, dos antibióticos testados. ....	23
<b>Figura 3.1-</b> Diagrama de distribuição de espécies para a Lmx com concentração $\approx 1 \text{ mmol/dm}^3$ .....	33
<b>Figura 3.2-</b> Diagrama de distribuição de espécies para o sistema binário (Cu:Lmx) concentração $\approx 1:2$ $\text{mmol/dm}^3$ .....	34
<b>Figura 3.3-</b> Diagrama de distribuição de espécies para o sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) com concentração $\approx 1:1:1 \text{ mmol/dm}^3$ .....	35

<b>Figura 3.4-</b> Diagrama de distribuição de espécies para o sistema binário (Cu:Lmx) com concentração $\approx 1:2 \mu\text{mol/dm}^3$ .....	36
<b>Figura 3.5-</b> Diagrama de distribuição de espécies para o sistema ternário Cu:Lmx:Phe com concentração $\approx 1:1:1 \mu\text{mol/dm}^3$ .....	37
<b>Figura 3.6-</b> Representação gráfica $A=f(c)$ para a Lmx com concentrações a partir de $1,5 \mu\text{mol/dm}^3$ em HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ , a $281 \text{ nm}$ (pico máximo para a Lmx) .....	40
<b>Figura 3.7-</b> Representação gráfica $A=f(c)$ para a complexo ternário $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$ com concentrações a partir de $1,5 \mu\text{mol/dm}^3$ em HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ a $274 \text{ nm}$ (pico máximo para o complexo) .....	40
<b>Figura 3.8-</b> Representação gráfica de $A=f(\lambda)$ , de $220 - 400 \text{ nm}$ para soluções de Lmx de concentração $\approx 20 \mu\text{mol/dm}^3$ em HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ , gráficos traçados na: 1ª hora – 2ª hora – 3ª hora – 4ª hora – radiação UV – .....	42
<b>Figura 3.9-</b> Representação gráfica de $A=f(\lambda)$ , de $220 - 400 \text{ nm}$ para soluções de $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O} \approx 20 \mu\text{mol/dm}^3$ em HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ , gráficos traçados na: 1ª hora – 2ª hora – 3ª hora – 4ª hora – radiação UV – .....	43
<b>Figura 3.10-</b> Representação gráfica de $IF=f(\lambda)$ correspondente à excitação a $281 \text{ nm}$ de Lmx, $1,44 \mu\text{mol/dm}^3$ em tampão HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ , com fendas de excitação a 10, correspondente a 15 ciclos seguidos (2 min entre cada ciclo). .....	44
<b>Figura 3.11-</b> Possível mecanismo de fotodecomposição da Lmx (adaptado de [1]) .....	45
<b>Figura 3.12-</b> Representação gráfico da $IF= f(\lambda)$ correspondente á excitação a $274 \text{ nm}$ de $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O} 1.904 \mu\text{mol/dm}^3$ em HEPES $10 \text{ mmol/dm}^3$ , $\text{pH} \approx 7,4$ , com fendas de excitação a 10, correspondente a 15 ciclos seguidos (2 min entre cada ciclo) .....	46

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1-</b> Evolução química das quinolonas até às fluoroquinolonas- relação estrutura-atividade (adaptada de [8] ) .....	3
<b>Tabela 1.2-</b> Constantes de acidez de algumas fluoroquinolonas [10, 11] .....	5
<b>Tabela 2.1-</b> Descrição genotípica e fenotípica das estirpes derivadas de <i>E. coli</i> K12 usadas (obtidas através do <i>E. coli</i> Genetic Stock Centre, Yale University, USA (1) ou da School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Germany (2). <sup>a</sup> Estirpe gentilmente cedida pelo Dr. Helge Wiengart (resultados por publicar). .....	20
<b>Tabela 3.1-</b> Valores das constantes de desprotonação da lomefloxacina .....	26
<b>Tabela 3.2-</b> Valores das constantes de acidez para a Lmx .....	27
<b>Tabela 3.3-</b> Valores das constantes de formação globais dos complexos binários Cu:Lmx .....	28
<b>Tabela 3.4-</b> Valores das constantes de estabilidade dos complexos binários Cu:Lmx.....	29
<b>Tabela 3.5-</b> Valores das constantes de formação globais para o sistema Phe:Lmx .....	30
<b>Tabela 3.6-</b> Valores das constantes de associação Phe:Lmx .....	31
<b>Tabela 3.7-</b> Valores das constantes de formação globais para os complexos ternários Cu:Lmx:Phe ...	31
<b>Tabela 3.8-</b> Valores das constantes de estabilidade para o sistema Cu:Lmx:Phe .....	32
<b>Tabela 3.9-</b> Valores de MIC obtidos experimentalmente para as estirpes testadas expressas em $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ .....	38
<b>Tabela 3.10-</b> Intervalos de concentração onde se verifica a lei de Lambert-Beer para a Lmx e $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$ para espectrofotometria UV-Vis e espectralfluorimetria expressas em $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ .....	41

# Lista de abreviaturas

**ADN**- Ácido desoxirribonucleico

**Lmx**- Lomefloxacina

**Phe**- 1,10-fenantrolina

**HEPES**- ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico

**MIC**- concentração inibitória mínima do inglês “*minimal inhibitory concentration*”

**E.** - *Escherichia*

**OmpF**- proteína F da membrana externa

**OmpC**- proteína C da membrana externa

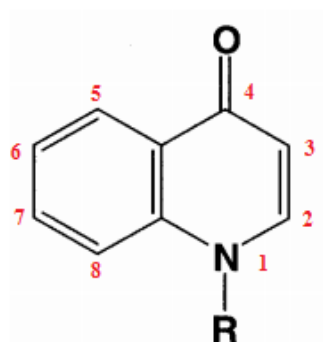


# 1 Introdução

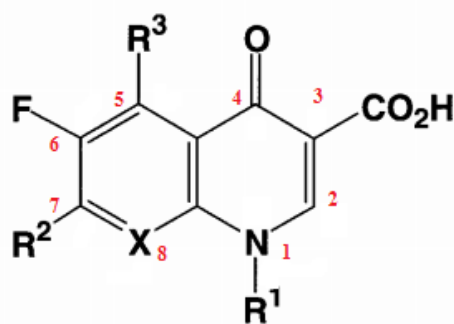
## teórica

## 1.1 Das quinolonas às fluoroquinolonas

O desenvolvimento e crescente interesse pelas quinolonas começou em 1962 quando Leshner e a sua equipa descobriram acidentalmente o ácido nalidíxico como sub-produto da síntese de um composto antimalárico [4]. Inicialmente, sintetizaram-se as chamadas 4-quinolonas (Figura 1.1) no entanto o seu espectro de ação era bastante reduzido, e como tal, as quinolonas eram utilizadas essencialmente no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativas, maioritariamente infeções do trato urinário e não eram aconselhadas no tratamento de infeções sistémicas [5, 6]. Apesar do surgimento de mecanismos de resistência a estes fármacos não ter tardado, esta descoberta permitiu o início do desenvolvimento de uma série de quinolonas modificadas. O primeiro passo foi a compreensão do mecanismo de ação das mesmas, a clarificação das relações estrutura-atividade com o intuito de melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, e ampliar o seu espectro de ação [7]. Assim, criaram-se condições propícias à síntese de novas quinolonas e, nos anos 80 constatou-se que adição de um flúor na posição 6 e um grupo piperazina na posição 7 do anel, favoreciam a atividade das quinolonas, nasciam assim as fluoroquinolonas, (cuja estrutura base representada na Figura 1.2). Assistiu-se então ao surgimento em massa de novas fluoroquinolonas mais potentes e com um espectro de ação muito alargado. Assim, a partir de meados dos anos 80, estes fármacos tornaram-se o maior grupo de antibióticos sintéticos, com indicações terapêuticas muito mais alargadas, tais como, o tratamento de infeções do sistema respiratório, sistema gastrointestinal, pele e tecidos moles. Na maioria dos tecidos e fluidos, as fluoroquinolonas são caracterizadas por boa penetração e excelentes índices terapêuticos. Na Tabela 1.1 constam alguns exemplos de quinolonas, e a relação entre as modificações na sua estrutura química com sua atividade.



**Figura 1.1-** Estrutura base das quinolonas (adaptada de [3] )



**Figura 1.2-** Estrutura base das fluoroquinolonas (adaptada de [3] )



**Tabela 1.1-** Evolução química das quinolonas até às fluoroquinolonas- relação estrutura-atividade (adaptada de [8] )

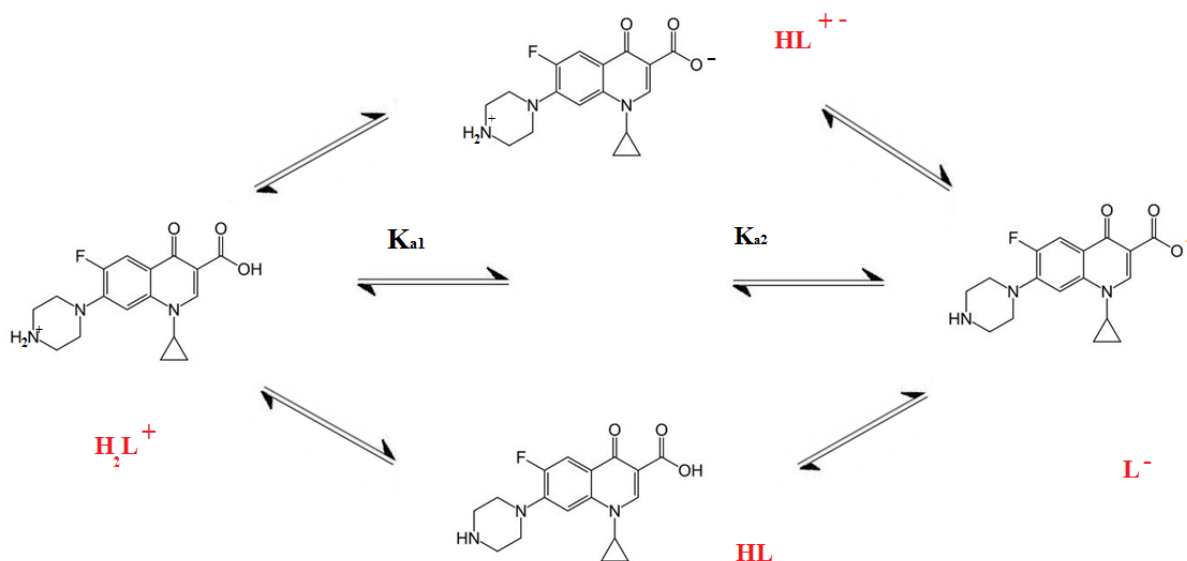
Estrutura	Nome	Atividade	Farmacocinética
Compostos de primeira geração (4-Quinolonas)			
1,8 naftiridíno	Ácido nalidíxico	Sem atividade para bactérias Gram-positivas	Absorção oral, pouca a moderada penetração nos tecidos
Segunda geração			
Substituintes 6,7,8 da cadeia lateral			
6-fluoro-7-piperazinil	Ciprofloxacina Pefloxacina Norfloxacina Ofloxacina	Potência acrescida contra bactérias Gram-negativas, e atividade limitada contra Gram-positivas	Elevada absorção; Maior penetração nos tecidos; Eliminação variável; Elevado tempo de semi-vida (uma dose diária)
6,8-difluoro-7-piperazinil	Lomefloxacina Fleroxacina		
Terceira geração			
6-fluoro-7-piperazinil	Temafloxacina	Atividade anti-Gram-positiva acrescida; Elevado espectro de ação	Tempo de semi-vida acrescido; Penetração respiratória excelente; Poucas interações com outros fármacos (exceto grepafloxacina); Aumento da lipofilicidade
6,8-difluoro-7-dimetilpiperazinil	Grepafloxacina		
6-fluoro-8-7-pirrolodinil	Clinafloxacina		
Quarta geração			
6-fluoro-8-metoxi-7-piperazinilo	Gatifloxacina	Atividade acrescida anti-Gram-positiva	As mesmas das quinolonas de terceira geração
6-fluoro-8-metoximino-naftiridona	Gemifloxacina	Potência conta agentes anti-anaeróbios	

## 1.2 As fluoroquinolonas

### 1.2.1 Propriedades físico-químicas

#### 1.2.1.1 pH e grau de ionização

As fluoroquinolonas apresentam um grupo ácido - grupo carboxílico na posição 3 - e um grupo básico, grupo piperazina - que lhes conferem um carácter anfotérico, ou seja, podem comportar-se como ácido ou base, dependendo do seu grau de protonação. O grau de protonação e desprotonação da fluoroquinolona, por sua vez, vai depender do pH do meio, podendo existir numa forma de ião dipolar ( $HL^{+-}$ ), catiónica ( $H_2L^+$ ), neutra ( $HL$ ) e aniónica ( $L^-$ ), sendo que, a pH fisiológico, as fluoroquinolonas se encontram total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de ião dipolar. Na Figura 1.3 apresenta-se um exemplo de ionização de uma fluoroquinolona (ciprofloxacina).



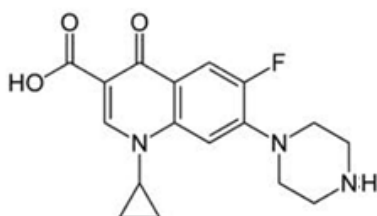
**Figura 1.3-** Mecanismo de ionização de uma fluoroquinolona (ciprofloxacina).

Através da análise da Tabela 1.2, constata-se que os valores das constantes de acidez, para várias fluoroquinolonas são muito similares, no entanto, as pequenas diferenças, são suficientes para alterar percentagem da(s) espécie(s) que se forma(m) ao pH fisiológico. Um exemplo concreto, para enrofloxacin, ao pH fisiológico forma-se 92% deste antibiótico na sua forma dipolar, 4% na forma

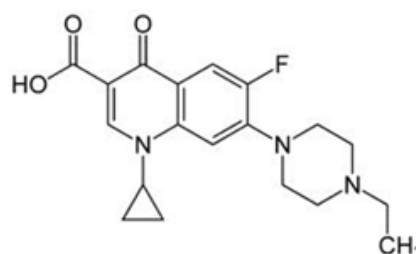
catiónica e 4% na sua forma aniónica, [9] já para a ciprofloxacina, ao mesmo pH, a espécie predominante é o ião dipolar (90%) ao qual se segue a sua forma aniónica que se forma em 10 %. Isto para elucidar, que se verificaram alterações na percentagem de formação das espécies ao pH fisiológico, decorrentes apenas de uma pequena alteração química, que é a troca de um átomo de hidrogénio por um grupo etilo, no anel piperazínico (Figura 1.4).

**Tabela 1.2-** Constantes de acidez de algumas fluoroquinolonas [10, 11]

Fluoroquinolona	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
<b>Ciprofloxacina</b>	6,15	8,66
<b>Enrofloxacin</b>	6,12	7,68
<b>Norfloxacin</b>	6,29	8,56
<b>Ofloxacin</b>	6,10	8,28



**A**



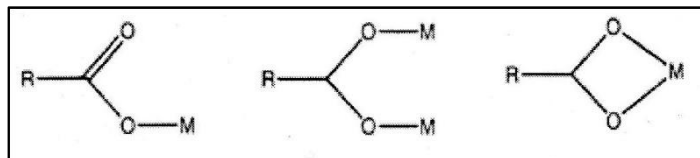
**B**

**Figura 1.4-** Estruturas das fluoroquinolonas ciprofloxacina (A) e enrofloxacin (B)

### 1.2.1.2 Complexação com catiões metálicos

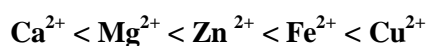
Tem-se verificado que a capacidade de determinada fluoroquinolona complexar com catiões metálicos pode melhorar a sua estabilidade em solução, mas também pode ter uma elevada influência na atividade biológica da mesma. A forma mais comum observada em complexos metal-quinolona é a quelatação do metal ao grupo carbonilo e a um dos oxigénios do grupo carboxílico, no entanto, quando

a coordenação é feita apenas através do grupo carboxílico, pode ser feita de três maneiras diferentes, como traduz a Figura 1.5 [12].

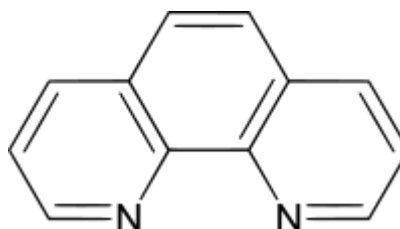


**Figura 1.5** - Modos de coordenação do grupo carboxílico ao metal[12]

Através da formação de complexos com diferentes quinolonas e diferentes cátions metálicos determinou-se a ordem das constantes de estabilidade obtidas, chegando-se à conclusão que os valores das constantes de estabilidade com cátions divalentes, segue a série de Irving-Williams [13]:



Alguns estudos estão de acordo com o que foi dito, havendo evidências que complexos de Cobre (II) coordenados a fluoroquinolonas e a outro ligando que seja dador de azoto, podem melhorar as propriedades farmacológicas, melhorando a atividade do complexo Cobre:fluoroquinolona [14]. Assim, neste trabalho vão ser estudados complexos de Cu (II) com a fluoroquinolona lomefloxacin, na presença e ausência de 1,10- fenatrolina (Figura 1.6), esta última, é um ligando com atividade biológica conhecida, pois apresenta atividade nuclease quando complexada ao Cu (II) [15, 16].



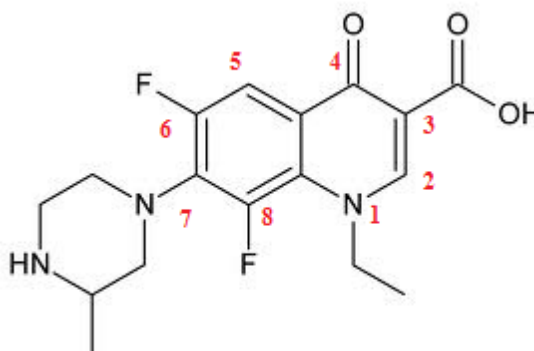
**Figura 1.6-** Estrutura química da 1,10-fenatrolina (adaptada de [www.chemicaland21.com](http://www.chemicaland21.com) consultada em 26/09/12)

Em suma, estas e outras propriedades das fluoroquinolonas vão determinar o seu comportamento farmacológico, tanto *in vitro* como *in vivo*, pois afetam a interação do fármaco com a componente lipídica membranar e, conseqüentemente com as porinas características da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é assim imprescindível o estudo das propriedades destes fármacos não só para entender o seu mecanismo de ação, mas também para desenvolver possíveis alterações/mudanças que permitam otimizar a atividade das mesmas.

## 1.2.2 Lomefloxacin

### 1.2.2.1 Relações estrutura-atividade

A lomefloxacin (Lmx), cuja estrutura se encontra representada na Figura 1.7, é uma fluoroquinolona de segunda geração aprovada em 1992 pela FDA. É caracterizada pela dupla fluorinação, uma delas na posição 6 e outra na posição 8. A fluorinação no carbono 6 confere-lhe um espectro de ação mais alargado, sendo altamente ativa contra uma variada gama de bactérias (Gram-negativas e Gram positivas), sendo, por isso, utilizada no tratamento de uma vasta lista de infeções, tais como: do trato respiratório, urinário, infeções urinárias, ginecológicas, oftamológicas, tecidos moles e outras. A fluorinação no carbono 8 é responsável pela elevada potência desta fluoroquinolona, por outro lado, pode causar efeitos adversos, nomeadamente, fototoxicidade, por exposição a radiação UV, uma vez que, pode ocorrer desfluorinação e se podem formar espécies/intermediários extremamente reativos [17-20].



**Figura 1.7-** Estrutura química da lomefloxacin ( adaptada de [3] )

### 1.2.3 Mecanismo de ação

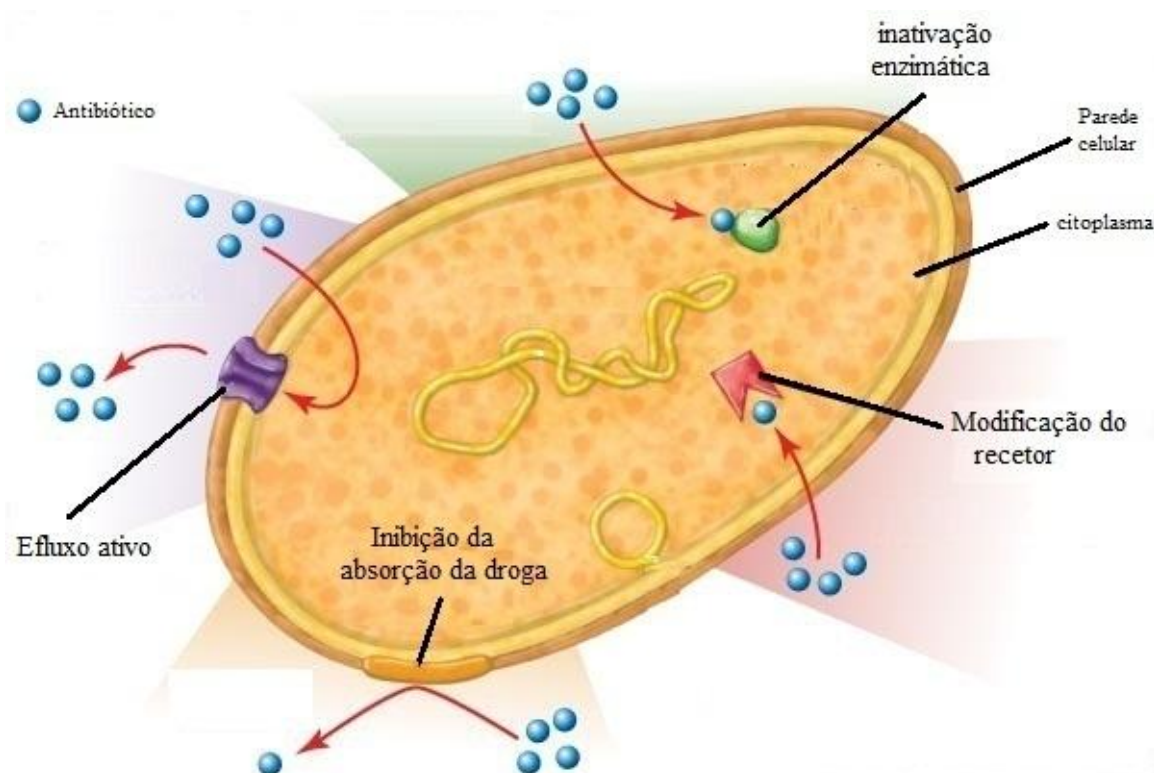
As quinolonas interferem na replicação, transcrição e reparação do ADN bacteriano ao inativar as enzimas topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV. Estas são responsáveis por provocar superenrolamento negativo que contraria o superenrolamento positivo resultante da separação de cadeias de ADN circular bacteriano. A associação entre o ADN e a girase mediada pelas quinolonas é irreversível, levando à desestabilização do cromossoma e posterior morte celular [21-23].

### 1.2.4 Mecanismos de resistência microbiana

Os mecanismos de resistência bacteriana são variados, mas podem ser resumidos nas seguintes classes:

1. **Degradação do antibiótico ou transformação numa espécie inativa** - ocorre quando a célula bacteriana produz enzimas que degradam ou transformam o agente antimicrobiano, tornando-o inativo.
2. **Modificação do recetor** – este ocorre quando o alvo intracelular ou recetor do antibiótico é alterado pelo microorganismo resultando na ineficiência da ligação bactéria-antibiótico e assim, na perda do efeito antibacteriano [24].
3. **Efluxo ativo** - este mecanismo é relevante em antibióticos que atuam no interior da célula bacteriana. Nestes casos, o microorganismo desenvolve um mecanismo de transporte ativo que “expulsa” o antibiótico, sendo que, este atinge uma concentração insuficiente para ter atividade antibacteriana.

Todos estes mecanismos estão sumarizados na Figura 1.8 para uma elucidação geral do processo de resistência.



**Figura 1.8-** Diferentes mecanismos de resistência bacteriana (adaptada de <http://www.britannica.com/>, página consultada a 14/09/12)

#### 1.2.4.1 Mecanismos de resistência microbiana a fluoroquinolonas

Antes de qualquer outra abordagem convém salientar que permeação das fluoroquinolonas nas membranas bacterianas é fundamental, uma vez que os alvos da ação destes fármacos são intracelulares. Estudos direcionados para a permeação membranar das fluoroquinolonas evidenciaram que um dos seus principais mecanismos de transporte é realizado através das porinas (Omp F,e/ou Omp C) da membrana externa de bactérias Gram-negativas. A resistência microbiana a fluoroquinolonas está frequentemente associada a mutações nas moléculas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou na diminuição da quantidade de fluoroquinolona no interior da bactéria, esta última pode ser justificada por um decréscimo da permeabilidade membranar ou pelo estímulo de bombas de efluxo. A diminuição da permeabilidade membranar deve-se, na maioria das vezes, à existência de mutações nos genes responsáveis pela expressão das porinas, um dos principais mecanismos de resistência bacteriana fluoroquinolonas [25-27]. Mutações que causam o aumento da expressão das bombas de efluxo, contribuem significativamente para o desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos e muitas destas bombas de efluxo quando sobre-expressas também exportam

outras classes de antibióticos não relacionadas, conferindo, às bactérias, fenótipos de multi-resistência [28].

O consumo excessivo de antibióticos tem também influência direta no aumento dos mecanismos de resistência. Note-se que, algumas fluoroquinolonas são usadas em tratamentos não complicados, sendo que, quanto maior for a intensidade de consumo de determinada fluoroquinolona, maior será a prevalência de estirpes resistentes a essa mesma fluoroquinolona [29].

## 1.3 Estrutura bacteriana

As células procarióticas são caracterizadas pela presença de um nucleóide localizado no citoplasma, parede celular e membrana plasmática. A parede celular é responsável pela morfologia celular e proteção mecânica, enquanto a membrana plasmática constitui uma barreira de permeabilidade seletiva, que intervém nos processos metabólicos (respiração e fotossíntese) e medeia o transporte de nutrientes. A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica à qual estão associadas variadas proteínas integrais e periféricas, sendo as primeiras mais abundantes.

### 1.3.1 Gram-negativas versus Gram-positivas

A composição química e estrutural da parede celular permite classificar as bactérias em Gram-negativas ou Gram-positivas. O espaço periplasmático das Gram-negativas é muito mais pequeno, que o respetivo das Gram-positivas. Além disto, nas Gram-negativas evidencia-se a presença de uma membrana externa (ao peptidoglicano), composta por lipopolissacáridos (LPS), fosfolípidos e proteínas, como é evidenciado na Figura 1.9. Refira-se ainda que a composição fosfolipídica das membranas das Gram-negativas é distinta, das Gram-positivas, sendo que, nas primeiras, se observa geralmente um teor elevado de fosfatidiletanolamina (PE) e nas segundas a predominância é de fosfatidilglicerol (PG) [2, 30].

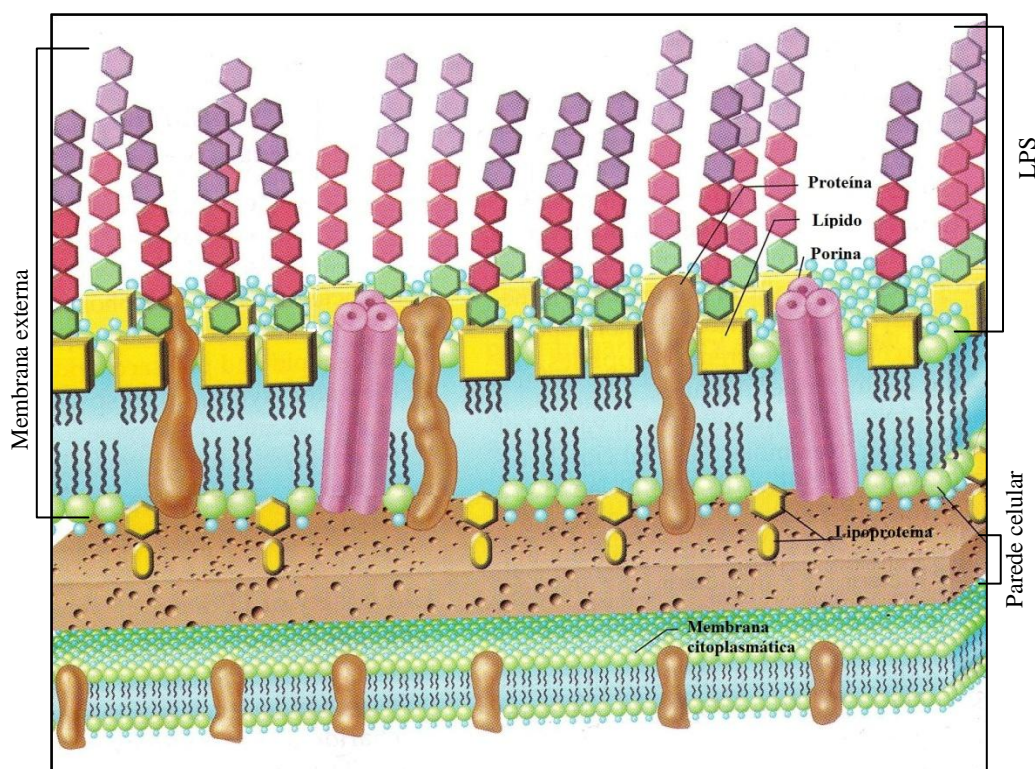
### 1.3.2 Membrana externa de bactérias Gram-negativas

A membrana externa das Gram-negativas possui dois folhetos de composições totalmente distintas. O folheto interno apresenta uma composição semelhante à da membrana citoplasmática, enquanto o folheto externo é principalmente composto por lipopolissacáridos (LPS) e proteínas [30]. Os LPS evidenciam três regiões distintas. Uma região mais hidrofóbica, ancorada à membrana externa, um núcleo de polissacáridos intermédio e uma cadeia polissacarídea de carácter mais hidrofílico que se expande para o exterior da célula bacteriana (como evidencia a Figura 1.9). De entre as variadas funções desempenhadas, os LPS podem contribuir para a diminuição da permeabilidade



membranar, evitando a internalização de antibióticos e substâncias tóxicas através da formação de uma estrutura mais rígida proveniente de interações entre moléculas de LPS adjacentes [30, 31]. Muitas das alterações na permeabilidade da membrana externa são frequentemente associadas a um aumento dos níveis de efluxo de antibióticos e até resistência intrínseca aos mesmos [32].

Note-se que a componente proteica do folheto externo da membrana externa compreende proteínas integrais, como a OmpA, porinas gerais como a OmpC, OmpF e PhoE e lipoproteínas. Sabe-se atualmente que a membrana de uma bactéria Gram-negativa, como a *Escherichia (E.) coli*, possui mais de  $10^5$  porinas [30, 33].



**Figura 1.9-** Parede celular e membrana externa das bactérias Gram-negativas (adaptada de [2]).

### 1.3.2.1 Porinas

O estudo das interações porina-antibiótico é fundamental para caracterizar o influxo dos agentes antimicrobianos. Assim, muitos dos mecanismos de resistência a alguns antibióticos podem passar precisamente por alterações na expressão de porinas, quer por expressão preferencial de outras porinas face a uma que permita a passagem do antibiótico, por decréscimo na expressão de porinas ou mesmo por mutações pontuais na sua sequência que poderão comprometer a afinidade com o antibiótico [32, 34].

#### 1.3.2.1.1 OmpC e OmpF

As porinas OmpC e OmpF (do inglês ‘*outer membrane protein*’) permitem a internalização de solutos hidrofílicos e de baixo peso molecular, podendo evidenciar uma ligeira seletividade no que respeita à carga e tamanho do soluto [35].

Estas proteínas são duas das mais importantes porinas em *E. coli*, apresentando-se sob a forma de homotrímeros sendo cada monómero constituído por 16 cadeias  $\beta$  antiparalelas formando um barril  $\beta$  transmembranar na membrana externa (ver Figura 1.10) [36]. A OmpC caracteriza-se por possuir um poro mais pequeno e ser mais seletiva para catiões, sendo preferida quando a bactéria cresce a altas pressões osmóticas. A OmpF, por outro lado, parece ser ideal quando a bactéria cresce em ambientes diluídos, dado que o seu poro de maiores dimensões permite uma difusão mais fácil dos solutos. Estudos recentes, contudo, defendem que a diferença entre OmpF e OmpC não reside propriamente nas dimensões poro, uma vez que nesta região as porinas apresentam uma homologia de 74% e muitos dos aminoácidos da zona de constrição são conservados. A principal diferença surge quando se comparam as propriedades eletrostáticas da zona da entrada extracelular dos canais, sendo que uma maior quantidade de resíduos carregados negativamente nesta zona na OmpC pode explicar, em alguns casos, a sua seletividade para catiões [36].

As fluoroquinolonas são um dos grupos de antibióticos cujo influxo mais parece envolver o canal das porinas [37-39], contudo existe ainda a hipótese das fluoroquinolonas entrarem na célula através de difusão lipídica pela membrana externa ou através da interface lípido-proteína [38, 39]. Os diferentes mecanismos de entrada parecem estar relacionados com a hidrofobicidade das fluoroquinolonas [40] e com a carga que a molécula apresenta ao pH fisiológico (carregada ou neutra) [38, 41], características que poderão condicionar o tipo de transporte que ocorre na entrada destes fármacos na célula, não estando, portanto, ainda definido(s) o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(ais) o transporte ocorre.

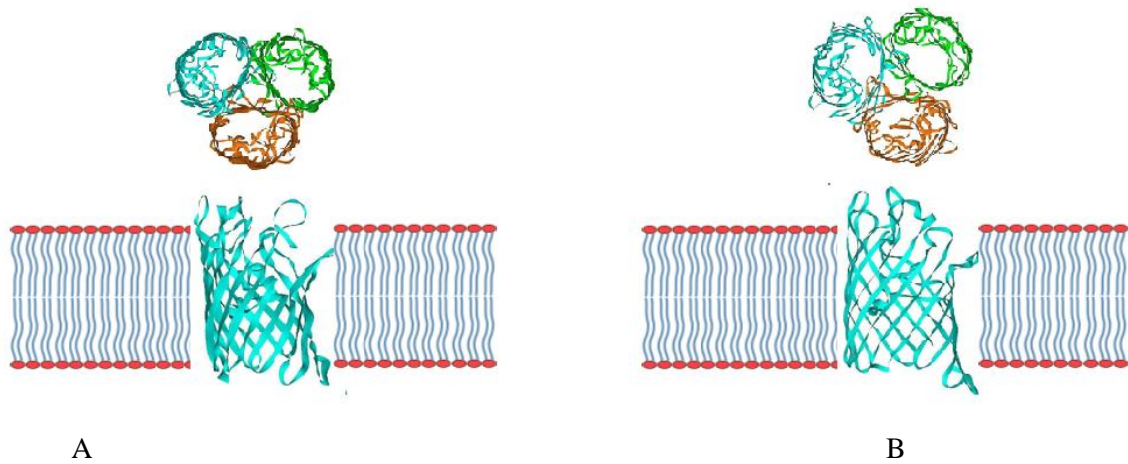


Figura 1.10- Representação simplificada da porinas OmpC (A) e OmpF (B)– visão da unidade monomérica de lado (em baixo) e visão de topo do homotrímero ( adaptada de <http://www.grin.com/en/doc/243402/mutational-analysis-of-the-proteins-btub-and-tonb-their-roles-in-cobalamin-> consultada a 16/09/12 )

## 2 Metodologia

Neste capítulo, são mencionados a instrumentação usada, reagentes, soluções e quaisquer outras condições experimentais relevantes.

## 2.1 Potenciometria

### 2.1.1 Reagentes e instrumentação

A lomefloxacin, (sigma), foi armazenada no frigorífico, protegida da luz e foi utilizada sem qualquer purificação adicional. O sal de catião de metal  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  foi adquirido à Merck (p.a.). Para o estudo potenciométrico foram ainda utilizados os seguintes reagentes: cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ , p.a.), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ , p.a.), solução padrão de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,1 M Titrisol, 1,10-fenantrolina mono-hidratada ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ , p.a.), pirogalhol cristalizado extra puro, cloreto de amónio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , p.a.) e solução padrão EDTA ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) 0,1 M. Todos estes reagentes foram adquiridos à Merck. Utilizou-se ainda murexida como indicador na padronização da solução de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . As pesagens de todos os compostos utilizados foram executadas nas balanças Analítica Mettler AT 201 ( $\pm 2 \times 10^{-5}$  g) e Semi-Analítica Mettler AE 160 ( $\pm 2 \times 10^{-4}$  g). As titulações potenciométricas foram realizadas num sistema de titulação automático composto por uma microbureta automática microBUR 2031 da CRISON, um decimilivoltímetro micropH 2002 da CRISON e um agitador microSTIRRER 2038 da CRISON. Foi ainda utilizada uma célula de paredes duplas, termostatzada ( $25 \pm 0,1$  °C) por um circulador de água Clifton. Para a realização das titulações potenciométricas foram usados dois elétrodos: indicador e de referência. O eletrodo indicador é um eletrodo de vidro da Russel- SWL/S7, ref. 49935/24, sensível ao catião hidrogénio, o eletrodo de referência foi um eletrodo de dupla junção ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ), da Russel- 90-00295. Os resultados das titulações potenciométricas foram registados num computador IBM compatível, ao qual se encontravam acoplados a microbureta e o decimilivoltímetro.

### 2.1.2 Soluções

As soluções mãe de fluoroquinolona e de 1,10-fenantrolina ( $1 \times 10^{-3}$  M) foram preparadas, por pesagem rigorosa dos sais respectivos seguida da sua dissolução em água desionizada tendo a força iónica sido ajustada a 0,1 M com  $\text{NaCl}$ . A concentração da fluoroquinolona (Lmx) foi determinada, espectrofotometricamente através da lei de Lambert-Beer. A concentração rigorosa da solução de Cobre (II) foi determinada através da titulação com uma solução padrão de EDTA/Titriplex (0,1 M).

A solução de hidróxido de sódio foi preparada a partir de  $\approx 1$  mL (medido com uma seringa) de uma solução saturada de hidróxido de sódio, diluído em 400 mL de água desionizada previamente fervida. A solução foi preparada sob atmosfera de argon de forma a impedir a carbonatação do

hidróxido. A solução de cloreto de sódio  $\approx 1$  M foi preparada por pesagem rigorosa do respectivo sal e dissolução em água desionizada. A solução de ácido clorídrico  $\approx 1 \times 10^{-3}$  M foi preparada rigorosamente a partir de uma solução padrão 0,1 M, por diluição em água desionizada (com ajuste de força iônica 0,1 M em NaCl). A solução aquosa de pirogalhol  $\approx 30$  g/dm<sup>3</sup> foi preparada por pesagem rigorosa deste composto e de hidróxido de sódio  $\approx 350$  g/dm<sup>3</sup>.

### 2.1.3 Titulações potenciométricas

As titulações potenciométricas baseiam-se na medição de uma diferença de potencial de soluções, quando se altera o seu equilíbrio por via de adição de um titulante. No caso deste trabalho, para realização das titulações potenciométricas, usou-se hidróxido de sódio como titulante, e com base nas variações de concentração de catião hidrogénio, calculou-se o valor das constantes de equilíbrio envolvidas nas reações de complexação de um catião metálico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) com o respectivo antibiótico (Lmx) e fenantrolina (Phe) (apenas no caso dos complexos ternários). As constantes determinadas possibilitaram inferir acerca da estabilidade dos respectivos complexos em solução. Quanto à adição do respectivo volume de titulante, este pode ser feito de duas formas, ou seja, se o volume de titulante adicionado ao longo da titulação é variável, de modo a abranger mais pontos na zona do ponto de equivalência (zona de declive mais acentuado), estamos perante uma titulação dinâmica, por sua vez, as titulações monotónicas são caracterizadas por adições de volume constantes de titulante, e desta feita, o número de pontos na zona de mudança brusca de pH é menor.

### 2.1.4 Sistema potenciométrico

O sistema potenciométrico utilizado é composto por uma microbureta e um decimilivoltímetro ligados a um computador IBM compatível.

Todas as titulações foram realizadas sob atmosfera inerte, num sistema fechado sob atmosfera de argón. O programa de aquisição de dados permitiu controlar os parâmetros relevantes para cada titulação nomeadamente: o volume da bureta, o modo de adição de volumes (fixo ou variável), os incrementos de adições, o volume total adicionado de titulante, o número de leituras realizadas para cada ponto, o critério de estabilidade, o tempo de espera após cada adição e o volume inicial adicionado. A análise visual da curva foi efetuada ao longo de toda a titulação e permitiu averiguar a existência de erros ou anomalias, que possam eventualmente ter ocorrido (problemas com os elétrodos, precipitação da solução etc). O armazenamento automático de todos os dados, possibilitou a representação gráfica da primeira derivada, e efetuou o cálculo do volume equivalente (pelo método de Gran) [42].

### 2.1.5 Calibração do sistema

A calibração do sistema foi efetuada através de titulações ácido forte-base forte (NaOH e HCl  $\approx$  0,06 e 1 mM respectivamente). Realizaram-se duas titulações, primeiro, a chamada calibração grande, que abrange toda a gama de pH, que possibilita não só verificar se houve carbonatação da solução de NaOH (fato que vai ser visível no gráfico da primeira derivada) mas também, avaliar o comportamento do elétrico ao longo de toda a titulação. Após assegurar o título da solução, realiza-se uma calibração apenas na zona ácida, os parâmetros obtidos através desta última vão permitir a calibração do sistema.

### 2.1.6 Método de Gran

Este método possibilitou a linearização das curvas de titulação, determinando, desta forma, parâmetros essenciais resultantes da calibração, tais como, volume equivalente ( $V_e$ ), concentração do titulante ( $C_b$ ), força eletromotriz padrão ( $E^{\circ}$ ), e o parâmetro da equação de Nernst (declive de Nernst,  $Q=2,303RT/F$ ). A grande vantagem deste método, se a titulação decorreu sem problemas, foi a possibilidade de obter estes parâmetros apenas com uma série de pontos, afastados do ponto de equivalência, fazendo com o tempo de execução experimental fosse minimizado.

### 2.1.7 Programas para tratamento de resultados

Após obtermos todos os parâmetros pelo método de Gran, os resultados foram tratados em programas específicos, Hyperquad 2008 [43] e HySS [44]. Estes foram utilizados na determinação das constantes de estabilidade dos sistemas estudados e na elaboração dos respectivos diagramas de distribuição, respetivamente (Figuras 2.1 e 2.2).

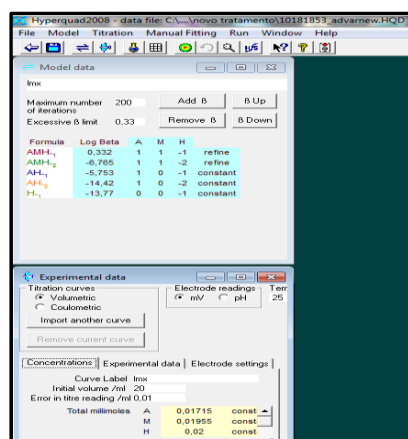


Figura 2.1- Hyperquad 2008

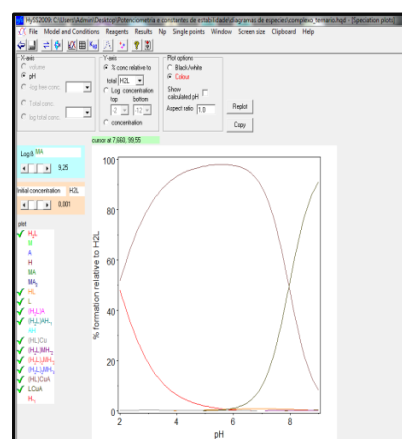


Figura 2.2- HySS

## 2.1.8 Determinação das constantes de acidez, associação e estabilidade

Para a determinação das constantes de acidez do ligando (Lmx) foi usada uma solução aquosa de ligando protonado a  $1 \text{ mmol/dm}^3$ , na presença de HCl a  $1 \text{ mmol/dm}^3$  ( $I=0,1 \text{ NaCl}$ ;  $25^\circ\text{C}$ ) titulada com uma solução de NaOH ( $0,06 \text{ mol/dm}^3$ ). Para determinação das constantes de associação entre os ligandos (Lmx e Phe) foi usada uma solução aquosa de HCl ( $1 \text{ mmol/dm}^3$ ;  $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ ;  $25^\circ\text{C}$ ) na presença dos dois ligandos a  $1 \text{ mmol/dm}^3$ , titulada com uma solução de NaOH ( $0,06 \text{ mol/dm}^3$ ). As constantes de estabilidade dos complexos de Cu (II) binário e ternário foram determinadas por titulação de uma solução de HCl ( $1 \text{ mmol/dm}^3$ ;  $I=0,1 \text{ NaCl}$ ;  $25^\circ\text{C}$ ) na presença de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  a  $1 \text{ mM}$ , com respectivos ligandos a  $1\text{-}2 \text{ mmol/dm}^3$  com uma solução de NaOH ( $\approx 0,06 \text{ mol/dm}^3$ ). Saliente-se que, todos estes ensaios foram realizados em atmosfera de árgon. Cada ensaio foi repetido, pelo menos, quatro vezes para determinação da precisão dos resultados.

Genericamente, as constantes de equilíbrio são definidas pela seguinte equação (1) e respetiva constante de equilíbrio (2):



$$\beta_{pqrs} = \frac{[\mathbf{M}]^p [\mathbf{H}_2\mathbf{L}]^q [\mathbf{H}]^r [\mathbf{A}]^s}{[\mathbf{M}]^p [\mathbf{H}_2\mathbf{L}]^q [\mathbf{H}]^r [\mathbf{A}]^s} \quad (2)$$

(onde M representa o metal,  $\text{H}_2\text{L}$  a fluoroquinolona na forma completamente protonada, H o protão e A é 1,10-fenantrolina, na forma neutra). As constantes de equilíbrio para os diferentes sistemas foram refinadas com programa Hyperquad 2008, que calculou o logaritmo das respetivas constantes.



## 2.2 Ensaios microbiológicos

Os estudos microbiológicos foram realizados numa câmara de fluxo laminar da BLUspace da International PBI (Figura 2.3)



**Figura 2.3-** Câmara de fluxo laminar usada

### 2.2.1 Soluções de agentes antimicrobianos

Todas as soluções de lomefloxacin (Lmx) e de complexo ternário  $[\text{Cu:Lmx:Phe:NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$ , foram preparadas em tampão HEPES (ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-etanossulfónico com grau de pureza  $\geq 99,5\%$ , Sigma)  $10\text{ mmol/dm}^3$ , pH ajustado a 7,4 e com força iónica  $100\text{ mmol/dm}^3$ , ajustada por adição de NaCl (Panreac). As soluções foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  e ao abrigo da luz até serem utilizadas.

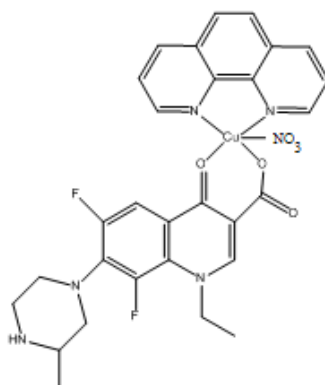
#### 2.2.1.1 Lomefloxacin

As soluções-mãe de lomefloxacin foram preparadas por pesagem rigorosa de lomefloxacin-HCl (Sigma) para concentrações entre  $15$  e  $20\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ .

#### 2.2.1.2 Complexo ternário

A solução-mãe de complexo ternário foi preparada por pesagem rigorosa de complexo  $[\text{Cu:Lmx:Phe:NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$  sintetizado no laboratório e cortesia da Mestre Isabel Sousa (resultados em

publicação) numa concentração da ordem dos  $16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ . A sua provável estrutura encontra-se na Figura 2.4.



**Figura 2.4-** Provável estrutura do complexo ternários.

### 2.2.2 Estirpes utilizadas

A descrição de todas as estirpes utilizadas encontra-se na Tabela 2.1

**Tabela 2.1-** Descrição genotípica e fenotípica das estirpes derivadas de *E. coli* K12 usadas (obtidas através do *E. coli* Genetic Stock Centre, Yale University, USA (1) ou da School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Germany (2). <sup>a</sup> Estirpe gentilmente cedida pelo Dr. Helge Wiengart (resultados por publicar).

Estirpe	Descrição de fenótipo	Descrição de genótipo	Fonte	Referência
<b>JF568</b>	OmpF <sup>+</sup> OmpC <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> , lacY29, proC24, tsx-63, purE41, λ <sup>-</sup> , aroA357, his-53, rpsL97(strR), xyl-14, metB65, cycA1, ilv-277, cycB2	1	[45, 46]
<b>JF701</b>	OmpF <sup>+</sup> OmpC <sup>-</sup>	JF568, <i>ompC264</i>	1	[47]
<b>JF703</b>	OmpF <sup>-</sup> OmpC <sup>+</sup>	JF568, aroA <sup>+</sup> , ompF254	1	[45, 46]
<b>W3110</b>	OmpF <sup>+</sup> OmpC <sup>+</sup>	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> IN(rrnD-rrnE)1 rph-1	2	[48]
<b>ΔFAC</b>	OmpF <sup>-</sup> OmpC <sup>-</sup>	W3110, Δ <i>ompF</i> Δ <i>ompC</i>	2	<sup>a</sup>

Os testes de suscetibilidade microbiana aos antibióticos, foram realizados utilizando cinco estirpes de *E. coli*, sendo que, uma delas foi a estirpe de referência ATCC 25922, utilizada para validação do método na determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) uma vez que é uma das estirpes padrão para ensaios de suscetibilidade microbiana a antibióticos e as suas MIC estão tabeladas [49]. Além desta, utilizaram-se várias estirpes de *E. coli* K12: a estirpe JF568 é a estirpe parental de duas mutantes com deleções ou na porina OmpF (JF703), ou na porina OmpC (JF701). Além destas, foram utilizadas duas estirpes adicionais, a *E. coli* W3110 e a W3110  $\Delta F\Delta C$ . A primeira destas estirpes foi testada como controlo da segunda que está desprovida de ambas as porinas OmpF e OmpC. Saliente-se que as estirpes mutantes JF701 e JF703 foram obtidas pela introdução de uma cassette de resistência ao antibiótico streptomina, a qual interrompe o gene que se pretende eliminar (OmpC, OmpF) e que lhes confere um fenótipo de seleção adicional.

### 2.2.3 Meios de cultura

O crescimento das culturas bacterianas foi conseguido em meios de cultura sólidos Mueller-Hinton Agar (Oxoid) e Iso-Sensitest (Oxoid) suplementado com Bacto Agar (BD) a 17 g/l de meio, seguindo-se a receita indicada pelo fabricante para a sua preparação. De igual modo, foram também preparadas alíquotas de meio de cultura líquido Iso-Sensitest para uso na determinação da concentração inibitória mínima das várias fórmulas antimicrobianas testadas. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos a 120 °C e armazenados a 4 °C até à utilização.

### 2.2.4 Preparação de inóculo bacteriano

O crescimento bacteriano foi promovido durante 18-24h em meio de cultura sólido numa estufa UM500 (Mettler) a 37 °C, por inoculação de microesferas ricas na estirpe pretendida provenientes de criotubos a -20 °C. Após o período de incubação, algumas colónias foram transferidas para uma ampola estéril API NaCl 0,85% 5 ml (bioMérieux) de forma a obter uma densidade bacteriana na ordem dos 0,5-1,0 na escala de McFarland (equivalente a cerca de  $10^8$  UFC/ml) [50]. A densidade óptica/densidade bacteriana foi medida num densitómetro DENSIMAT (bioMérieux) especialmente desenhado para este efeito, correspondendo precisamente à escala de McFarland.

### 2.2.5 Determinação da concentração inibitória mínima

O procedimento adoptado na determinação de concentrações inibitórias mínimas segue as linhas gerais do recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute no que diz respeito à metodologia por microdiluição em placa [51]. Foram utilizadas placas plásticas esterilizadas com 96

poços (8x12), cada uma permitindo 7 ensaios de determinação de MIC num total de 42 ensaios efetuados para cada par agente antimicrobiano/estirpe bacteriana testados. A última coluna de poços foi usada como controlo positivo de crescimento bacteriano (antibiótico ausente) e a última linha como controlo negativo (controlo estéril na ausência de microrganismo). (Ver Figura 2.5)

## 2.2.6 Diluição em placa

### 2.2.6.1 Microdiluição do agente antimicrobiano

Antes de aplicação na placa, todos os antibióticos e metaloantibióticos (com as concentrações referidas anteriormente) foram esterilizados por filtração através de um filtro de membrana PES estéril com poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Após a adição de 50  $\mu\text{l}$  de meio de cultura líquido a todos os poços da placa, outros 50  $\mu\text{l}$  de antibiótico são adicionados à primeira coluna de poços. O seu conteúdo é homogeneizado e são retirados 50  $\mu\text{l}$  desta mistura para a segunda coluna de poços. Este procedimento é repetido até à 11ª coluna de poços, sendo os 50  $\mu\text{l}$  de mistura meio de cultura/fórmula antimicrobiana de lá retirados descartados, fazendo desta o referido controlo positivo sem antibiótico. Deste modo garante-se, de coluna para coluna, uma diluição de 1:2 do agente antimicrobiano.

### 2.2.6.2 Adição do agente microbiano

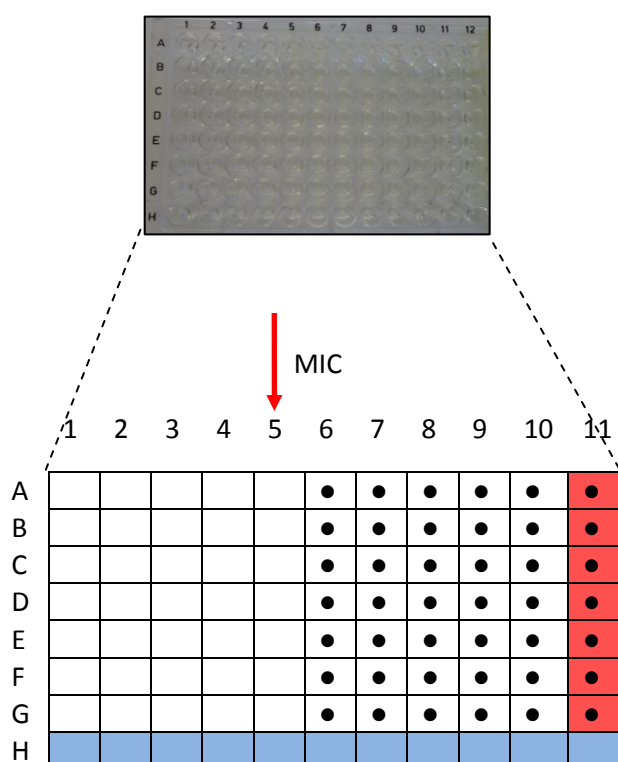
Após estabelecimento do gradiente de concentração do agente antimicrobiano, 50  $\mu\text{l}$  de suspensão bacteriana a  $10^6$  UFC/ml (diluição 1:100 em água destilada estéril do inóculo preparado em 2.4.4.) são adicionados a todos os poços da placa exceto aos da última linha (fazendo desta o referido controlo negativo). Cumpre-se assim a referida segunda fase da diluição de 1:2 (50  $\mu\text{l}$  num volume final de 100  $\mu\text{l}$  em cada poço), estabelecendo-se a concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml como pretendido. Esta adição da suspensão bacteriana vai determinar as concentrações finais de antibiótico na placa onde a 11ª coluna apresenta um fator de diluição 1:4096 (1:1024 face à primeira, ver Figura 2.5).

## 2.2.7 Incubação das placas

As placas eram então tapadas e colocadas em caixas plásticas com algodão humedecido (para garantir a hidratação dos poços) e incubadas em estufa a 37°C durante 18-24h.

### 2.2.8 Leitura e interpretação dos resultados

Após o período de incubação, a leitura das placas era feita avaliando quais os poços em que ocorria crescimento bacteriano visível, por comparação com o controlo positivo. Caso não fosse registado qualquer crescimento no controlo positivo, ou este fosse evidente no controlo negativo, as placas eram rejeitadas. A concentração inibitória mínima (MIC) era, pois, equivalente à concentração mais baixa de antibiótico em que não ocorria crescimento (ver Figura 2.5). Para cada placa, obtiveram-se 7 diferentes valores de MIC e, no total, para cada par antibiótico/estirpe, recolheram-se pelo menos 42 valores concordantes de MIC, o equivalente a pelo menos 6 placas (cada uma inoculada com uma suspensão bacteriana independente). A MIC final considerada equivale ao valor médio dos valores obtidos associada a um desvio padrão calculado. Note-se que podem existir valores de MIC cujo desvio padrão seja nulo o que se verifica quando todas as placas resultaram num mesmo valor de MIC.



**Figura 2.5-** Placa exemplificativa para determinação da concentração inibitória mínima, dos antibióticos testados.

- Controlo positivo de crescimento bacteriano
- Controlo negativo
- Crescimento bacteriano

## 2.3 Estudos espectroscópicos

### 2.3.1 Soluções e instrumentação

#### 2.3.1.1 UV-Vis

Para testar a aplicabilidade das leis de Lambert-Beer utilizaram-se soluções de concentração 5 a 25  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  de Lmx e  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$  para determinar a gama de validade da lei e simultaneamente escolher uma concentração ideal para os ensaios fluorimétricos, onde não se verifique efeito de filtro.

Para os ensaios de UV-Vis, usaram-se soluções de Lmx e de  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$  com concentrações  $\approx 20\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , os espectros das soluções foram traçados de hora em hora, sendo que, no final a solução foi sujeita a 30 minutos de radiação UVB de 253,7 nm (radiação facultada pela câmara de fluxo laminar), para este efeito recorreu-se a um espectrofotómetro UV-3600 da SHIMADZU, equipado com TCC-CONTROLLER da SHIMADZU para o controlo da temperatura.

Saliente-se que todas as soluções foram preparadas em tampão HEPES, 10  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ , pH ajustado a 7,4, força iónica de 100  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ , ajustada por adição de NaCl (Panreac) e estiveram sujeitas a uma temperatura constante de 37 °C.

#### 2.3.1.2 Fluorimetria

Para os estudos de fluorimetria usaram-se igualmente soluções Lmx e de  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$ , desta feita com concentrações  $\approx 2\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ , (em tampão HEPES 10  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ , pH ajustado a 7,4 e com força iónica 100  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ) sujeitas a uma temperatura constante de 37 °C.

Foi usado um espectralfluorímetro Cary Eclipse da VARIAN (equipado com dispositivo de controlo rigoroso de temperatura), a excitação foi realizada com a fenda de excitação a 10, a comprimentos de onda de 281 nm (no caso da Lmx) e 274 nm (no caso do  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$ ). Para cada antibiótico traçaram-se espectros correspondentes a 15 ciclos seguidos (com 2 minutos de intervalo entre cada ciclo)

# 3 Resultados e discussão

### 3.1 Potenciometria

#### 3.1.1 Titulações potenciométricas

Inicialmente calcularam-se as constantes de acidez da lomefloxacina, usaram-se estas últimas para o cálculo das constantes de estabilidade para os sistemas binários, nas proporções de 1:1 e 1:2 (Cu:Lmx). Seguidamente calcularam-se as constantes de associação Lmx:Phe (1:1) (tendo em conta também a constante de acidez da fenantrolina), e finalmente, usaram-se todas as constantes determinadas nos sistemas binários, para o cálculo das constantes de estabilidade do complexo ternário caracterizado pela presença da fenantrolina (como ligando), da lomefloxacina, e o catião cobre (II) na proporção de 1:1:1 (Cu:Lmx:Phe)

#### 3.1.2 Determinação das constantes de acidez da lomefloxacina

O cálculo das constantes de acidez, assumiu os equilíbrios representados pelas equações químicas seguintes, tendo em conta o valor da constante de autoprotólise da água.



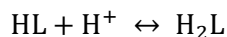
Os valores das constantes de equilíbrio, encontram-se na Tabela 3.1

**Tabela 3.1-** Valores das constantes de desprotonação da lomefloxacina

Espécies		Constantes de desprotonação
<b>HL</b>	$\text{Log}\beta_{01-10}$	$-5,75 \pm 0,05$
<b>L</b>	$\text{Log}\beta_{01-20}$	$-14,40 \pm 0,13$



A constante de equilíbrio representada pela equação (4) pode ser relacionada com o equilíbrio seguinte,



através das equações:

$$\text{pKa}_1 = - (\text{Log} \beta_{01-10})$$

$$\text{pKa}_2 = - (\text{Log} \beta_{01-20} + \log \beta_{0-110})$$

Os valores das constantes de acidez encontram-se na Tabela 3.2

**Tabela 3.2-** Valores das constantes de acidez para a Lmx

$\text{pKa}_1 = 5,75 \pm 0,05$
$\text{pKa}_2 = 8,65 \pm 0,13$

De salientar que estes valores estão de acordo com os intervalos esperados para as fluoroquinolonas.  $\text{pKa}_1$  [5,7-6,2]  $\text{pKa}_2$  [7,9-8,9] [9, 11, 13, 52]

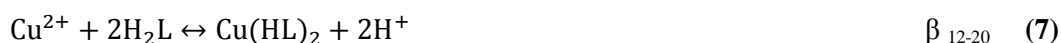
A pH ácido a fluoroquinolona está completamente protonada, isto é, sob a forma de  $\text{H}_2\text{L}$ , enquanto que a pH mais básico a fluoroquinolona se poderá encontrar completamente desprotonada (sob a forma de L).

### 3.1.3 Determinação de constantes de estabilidade

#### 3.1.3.1 Sistemas binários

##### 3.1.3.1.1 Complexos de cobre (II)

O modelo para o cálculo das constantes de estabilidade dos complexos binários assumiu os equilíbrios definidos pelas equações seguintes, bem como, o valores das constantes de: autoprotólise da água, de acidez da Lmx e da hidrólise de cátions divalentes.



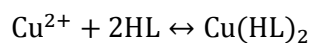
Os valores das constantes de formação globais encontram-se na Tabela 3.3

**Tabela 3.3-** Valores das constantes de formação globais dos complexos binários Cu:Lmx

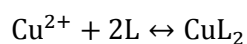
Espécies		Constantes de formação
<b>CuHL</b>	$\text{Log}\beta_{11-10}$	$0,34 \pm 0,01$
<b>CuL</b>	$\text{Log}\beta_{11-20}$	$-6,73 \pm 0,03$
<b>Cu(HL)<sub>2</sub></b>	$\text{Log}\beta_{12-20}$	$-0,99 \pm 0,15$
<b>CuL<sub>2</sub></b>	$\text{Log}\beta_{12-40}$	$-17,34 \pm 0,15$

Ao relacionar as constantes de formação globais (equações 5 a 8) com as constantes de acidez da Lmx foi possível o cálculo das constantes de estabilidade dos complexos binários, cuja formação é traduzida pelas equações seguintes:





$$\text{LogK}_{\text{Cu}(\text{HL})_2} = \log\beta_{12-20} - 2 \log\beta_{01-10}$$



$$\text{LogK}_{\text{CuL}_2} = \log\beta_{12-40} - 2 \log\beta_{01-20}$$

Os valores das constantes de estabilidade, encontram-se na Tabela 3.4

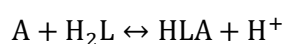
**Tabela 3.4-** Valores das constantes de estabilidade dos complexos binários Cu:Lmx

Espécies		Constantes de estabilidade
<b>CuHL</b>	LogK CuHL	$6,09 \pm 0,05$
<b>CuL</b>	LogK CuL	$7,67 \pm 0,13$
<b>Cu(HL)<sub>2</sub></b>	LogK Cu(HL) <sub>2</sub>	$10,51 \pm 0,16$
<b>CuL<sub>2</sub></b>	LogK CuL <sub>2</sub>	$11,46 \pm 0,23$

Os valores obtidos estão de acordo com os obtidos para a complexação de outras fluoroquinolonas com cátions metálicos divalentes [13, 52-56].

#### 3.1.3.1.2 Sistema Lmx:Phe

Para o cálculo das constantes de associação dos ligandos, foram considerados os equilíbrios definidos pelas seguintes equações, tendo em conta o valor das constantes: de autoprotólise da água e de acidez da Lmx e da Phe.



$$\beta_{01-11} \quad (9)$$



Os valores das constantes de formação para este sistema encontram-se na Tabela 3.5

**Tabela 3.5-** Valores das constantes de formação globais para o sistema Phe:Lmx

Espécies		Constantes de formação
HLA	$\text{Log}\beta_{01-11}$	$-3,45 \pm 0,09$
LA	$\text{Log}\beta_{01-21}$	----
(HL)(HA)	$\text{Log}\beta_{0101}$	$2,69 \pm 0,06$

Ao relacionar as constantes de formação globais (equações 9 a 11) com as constantes de acidez da Lmx e da Phe, foi possível o cálculo das constantes de associação destas espécies, cuja formação é traduzida pelas equações seguintes:



Os valores das constantes de associação encontram-se na Tabela 3.6

**Tabela 3.6-** Valores das constantes de associação Phe:Lmx

Espécies		Constantes de associação
<b>HLA</b>	$\text{LogK}_{\text{HLA}}$	$2,29 \pm 0,10$
<b>LA</b>	$\text{LogK}_{\text{LA}}$	--
<b>(HL)(HA)</b>	$\text{LogK}_{(\text{HL})(\text{HA})}$	$8,44 \pm 0,08$

### 3.1.3.2 Sistema ternário

O modelo assumido para o cálculo das constantes de estabilidade das espécies ternários assumiu os equilíbrios definidos pelas equações seguintes, bem como, os valores de todas as constantes determinadas anteriormente e ainda as constantes de estabilidade da Phe com o catião Cu(II) [55], e a constante de autoprotólise da água.

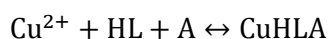


Os valores das constantes de formação, encontram-se na Tabela 3.7

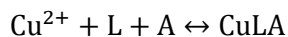
**Tabela 3.7-** Valores das constantes de formação globais para os complexos ternários Cu:Lmx:Phe

Espécies		Constantes de formação
<b>CuHLA</b>	$\text{Log}\beta_{11-11}$	$10,6 \pm 0,07$
<b>CuLA</b>	$\text{Log}\beta_{11-21}$	$2,70 \pm 0,05$

Ao relacionar as constantes de equilíbrio globais (equações 12 e 13) com as constantes de acidez da Lmx e da Phe, foi possível o cálculo das constantes de estabilidade para as espécies ternárias (Cu:Lmx:Phe 1:1:1), cuja formação é traduzida pelas equações seguintes:



$$\text{LogK}_{\text{CuHLA}} = \log\beta_{11-11} + \log\beta_{01-10}$$



$$\text{LogK}_{\text{CuLA}} = \log\beta_{11-21} + \log\beta_{01-20}$$

Os resultados das constantes de estabilidade para as duas espécies ternárias encontram-se na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8-** Valores das constantes de estabilidade para o sistema Cu:Lmx:Phe

Espécies		Constantes de estabilidade
<b>CuHLA</b>	$\text{LogK}_{\text{CuHLA}}$	$16,35 \pm 0,09$
<b>CuLA</b>	$\text{LogK}_{\text{CuLA}}$	$17,10 \pm 0,14$

As constantes obtidas, são (comparativamente ao complexo binário) substancialmente mais elevadas, o que sucede também para outros complexos de cobre divalente com fenantrolina e fluoroquinolonas [55, 57].

### 3.1.4 Diagramas de distribuição de espécies

Através do programa Hyss 2009 traçaram-se os diagramas que representam distribuição de espécies ao longo do pH, ou seja, a especiação em função do pH. Para o efeito, bastou definir as

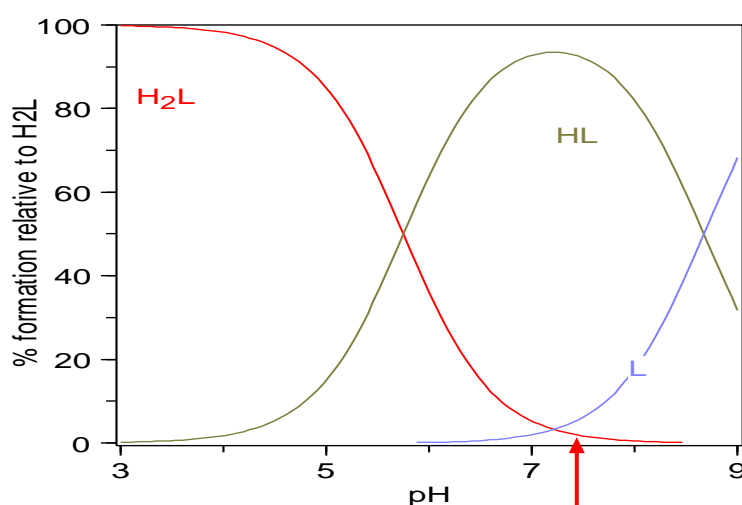
condições finais e iniciais, os equilíbrios relevantes, bem como, a gama de pH que se pretendia abranger. Saliente-se que no caso dos complexos (binário e ternário) foi crucial avaliar qual /quais as espécies maioritárias ao pH fisiológico, ou seja, avaliar, se de fato, o antibiótico na sua forma complexada existe/coexiste ao pH fisiológico.

### 3.1.4.1 Concentrações não fisiológicas

Neste momento, os gráficos foram traçados usando as concentrações da ordem dos ensaios potenciométricos (na gama dos mmol/dm<sup>3</sup>)

#### 3.1.4.1.1 Lomefloxaxina (Lmx)

O diagrama de distribuição de espécies da lomefloxaxina (Figura 3.1) reflete o comportamento do antibiótico no intervalo de pHs relevante..



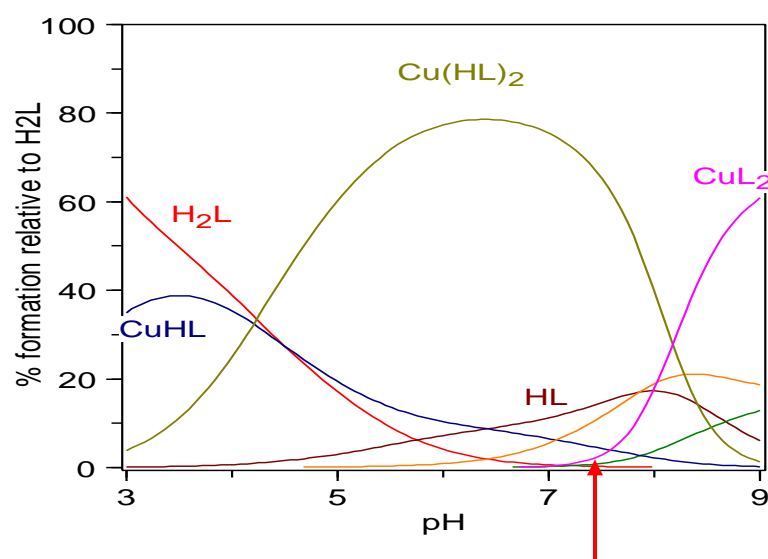
**Figura 3.1-** Diagrama de distribuição de espécies para a Lmx com concentração  $\approx 1\text{mmol/dm}^3$

Através da análise do digrama de distribuição de espécies, é visível que a pH ácido a lomefloxaxina se encontra completamente protonada e por isso, na forma de H<sub>2</sub>L, enquanto a pH mais elevado o antibiótico se encontra sob forma da espécie L [9, 13, 58]. Estas observações tornam-se mais claras quando relacionadas com a estrutura da lomefloxaxina, isto é, sabendo que a lomefloxaxina tem dois grupos ionizáveis relevantes, o grupo piperazinilo no carbono 7 e o grupo ácido carboxílico no carbono 3, é de esperar que, sendo o grupo ácido carboxílico um ácido mais forte, sofra a primeira desprotonação, o sistema evolui espontaneamente para a formação da espécie de ião

dipolar (HL), até que, a espécie sofre a segunda desprotonação (no grupo piperazina) a pHs básicos. O  $pK_{a1}$  corresponde á primeira desprotonação e tem o valor de 5,75, note-se que, a partir deste valor a espécie HL passa a ser a espécie predominante no sistema, até sofrer a segunda desprotonação, sensivelmente a  $pH = 8,65$ , a partir deste pH, a espécie predominante passa a ser a espécie completamente desprotonada (L), estes fatos podem ser facilmente observados quando se analisa o respetivo diagrama.

#### 3.1.4.1.2 Sistema binário (Cu:Lmx) 1:2

No diagrama seguinte figura a distribuição das espécies em função do pH, o principal objetivo é inferir acerca da estabilidade do complexo binário em solução ao pH fisiológico ( $\approx 7,4$ ).



**Figura 3.2-** Diagrama de distribuição de espécies para o sistema binário (Cu:Lmx) concentração  $\approx 1:2$  mmol/dm<sup>3</sup>

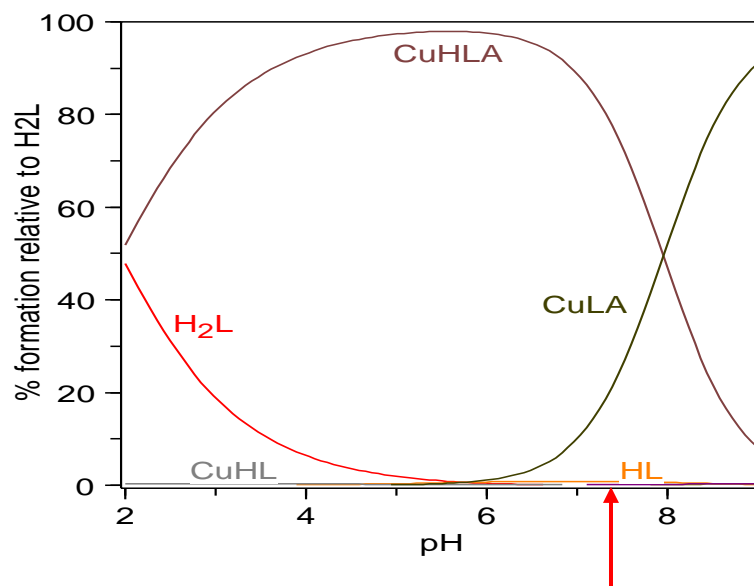
Através da análise do diagrama (Figura 3.2), podemos observar que a  $pH \approx 7,4$  a espécie que se formou em maior percentagem foi a espécie complexada binária  $Cu(HL)_2$  (cerca 70%), assim, foi a



espécie predominante e mais estável em solução nestas condições, note-se, que o valor das constantes determinadas anteriormente para as espécies binárias era relativamente elevado, nestas condições.

#### 3.1.4.1.3 Sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) 1:1:1

Procedemos de igual forma para averiguar se o complexo ternário era estável a pH fisiológico, analisando o diagrama que se segue (Figura 3.3)



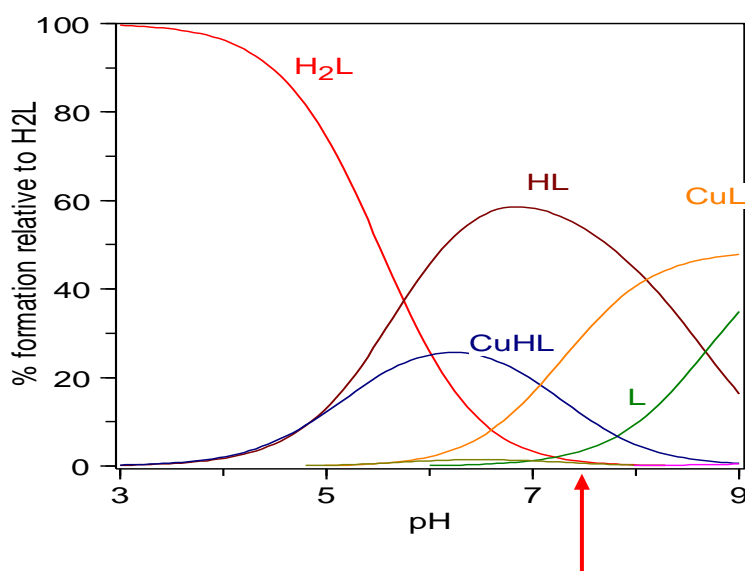
**Figura 3.3-** Diagrama de distribuição de espécies para o sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) com concentração  $\approx 1:1:1$  mmol/dm<sup>3</sup>

Através da análise do diagrama (Figura 3.3) foi notório, que a espécie maioritária a pH fisiológico é a espécie complexada CuHLA, sendo que, esta se formou numa percentagem que ronda os 80%, pode-se não só afirmar que a espécie ternária CuHLA é a espécie mais estável a pH  $\approx 7,4$ , mas também, que é mais estável que a espécie binária, facto que pode ser comprovado pela comparação dos valores das respetivas constantes de estabilidade determinadas anteriormente. Para além disto, a mistura de espécies a pH  $\approx 7,4$ , é menor no caso do sistema ternário, em que se verificou apenas a presença de espécies complexadas.

#### 3.1.4.2 Concentrações fisiológicas

A partir deste momento passamos a avaliar a especiação em função do pH nas concentrações fisiológicas, isto é, com concentrações da ordem dos micromoles/dm<sup>3</sup>, simulando as concentrações fisiológicas, só assim se pode realmente concluir acerca do que efetivamente se passa no organismo, saliente-se que esta gama de concentrações foi a usada nos testes microbiológicos. Assim, seguiram-se os diagramas de distribuição de espécies, para os complexos binário e ternário (Figuras 3.4 e 3.5), nas concentrações fisiológicas.

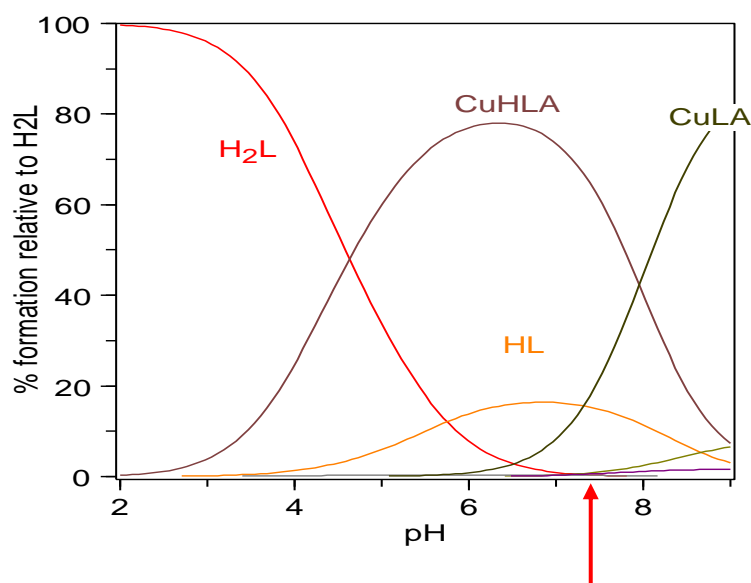
#### 3.1.4.2.1 Sistema binário (Cu:Lmx) 1:2



**Figura 3.4-** Diagrama de distribuição de espécies para o sistema binário (Cu:Lmx) com concentração  $\approx 1:2 \mu\text{mol/dm}^3$

Para o sistema binário através da análise da Figura 3.4, são de enfatizar as mudanças, de extrema relevância, uma vez que se verifica que a espécie complexada ( $\text{Cu}(\text{HL})_2$ ), presente em maioria no diagrama do sistema binário anterior deixou de se formar (possivelmente sofreu dissociação nestas concentrações), dado que não se observam espécies complexadas que se formem em maior percentagem, não se justificam estudos posteriores da sua atividade microbiológica, pelo que, os complexos binários, foram neste momento descartados.

## 3.1.4.2.2 Sistema ternário (Cu:Lmx:Phe) 1:1:1



**Figura 3.5-** Diagrama de distribuição de espécies para o sistema ternário Cu:Lmx:Phe com concentração  $\approx 1:1:1$   $\mu\text{mol/dm}^3$

Para o complexo ternário, cujo diagrama de distribuição corresponde à Figura 3.5, a observação essencial foi que, a pH fisiológico, a espécie maioritária continuou a ser a espécie ternária complexada (CuHLA). Os estudos seguintes foram, portanto realizados com esta solução, nestas condições. (concentração e pH fisiológicos)

## 3.1.5 Estudos microbiológicos

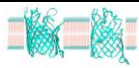
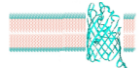
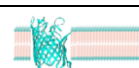
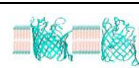

## 3.1.5.1 Concentração inibitória mínima (MIC) para as estirpes testadas.

A determinação da concentração inibitória mínima de um agente antimicrobiano não constitui apenas uma ferramenta para avaliar a resistência de uma dada estirpe bacteriana a esse mesmo agente mas, permite, com a utilização de estirpes mutantes, avaliar o impacto de uma determinada alteração bioquímica (por exemplo, a ausência da expressão de uma proteína) na viabilidade ou na proliferação das células bacterianas na presença de fármacos. Neste caso, a mutação da porina OmpF e/ou OmpC permite inferir acerca da importância de cada porina isoladamente ou em conjunto, na entrada na

membrana bacteriana quer da lomefloxacin quer do complexo ternário. Pretende-se assim entender um pouco melhor o mecanismo de entrada destes fármacos, enfatizando até que ponto as mudanças estruturais e químicas realizadas aquando da complexação, influenciam ou modificam o mecanismo de entrada na bactéria.

Os resultados das MIC com *E. coli* ATCC 25922 permitem a validação do método para a lomefloxacin cujo intervalo de referência pode variar de 0,03 a 0,12 µg/mL, que corresponde a um intervalo 0,077 a 0,31 µmol/dm<sup>3</sup> [9], logo o valor obtido encontra-se claramente no intervalo (ver Tabela 3.9).

**Tabela 3.9-**Valores de MIC obtidos experimentalmente para as estirpes testadas expressas em µmol/dm<sup>3</sup>

Microorganismo		MIC (Lmx)	MIC([Cu:Lmx:Phe.NO <sub>3</sub> ].4H <sub>2</sub> O)
<b>ATCC 25922</b>		0,16 ± 0,06	0,18 ± 0,07
	JF 568	0,50 ± 0,07	0,50 ± 0,06
	JF 701	0,48	0,53 ± 0,07
	JF 703	0,51 ± 0,10	0,59 ± 0,19
	W3110	0,31 ± 0,10	0,26 ± 0,05
	W3110 ΔCΔF	0,53	0,26 ± 0,04

Para a lomefloxacin verificamos que os valores de MIC para a estirpe parental JF568 e para as estirpes mutantes JF701 e JF703 são muito similares, o que poderá significar que a sua atividade microbiológica é pouco dependente das porinas OmpF e OmpC isoladamente. O estudo foi estendido às estirpes W3110 (estirpe parental) e W3110 ΔCΔF, de forma a avaliar o efeito da dupla deleção das porinas e não existiam estirpes equivalentes às anteriores, sem ambas as porinas. Apesar de ambas as estirpes parentais (JF568 e W3110) serem derivadas da *E. coli* K12 e terem genótipos e uma composição em porinas semelhantes, as diferenças existentes nos seus genótipos são suficientes para que a MIC para a Lmx seja um pouco diferente (0,50 ± 0,07 e 0,31 ± 0,10, respetivamente). A determinação desta última serviu portanto de controlo para o efeito da dupla mutação que levou a uma menor suscetibilidade à fluoroquinolona.

Os resultados parecem indicar que ainda que a ausência de uma das porinas individualmente não se traduza numa diminuição de suscetibilidade à lomefloxacina, a ausência simultânea da OmpF e da OmpC limita de alguma forma o acesso do antibiótico ao alvo celular. Este fenómeno pode significar uma dependência real de pelo menos uma das porinas para o influxo em *E. coli* mas, pode também ser interpretado com uma dificuldade estérica de permeação que resulta do rearranjo da membrana na ausência das suas mais abundantes porinas ou da necessidade da interface entre a proteína e a bicamada lipídica para a entrada na célula.

No que se refere ao complexo  $[Cu:Lmx:Phe.NO_3].4H_2O$  verifica-se que este parece ter um comportamento semelhante à lomefloxacina, parecendo não ter dependência relevante das porinas OmpF e OmpC isoladamente, e parecendo também que as alterações químicas e estruturais que resultam da complexação da Lmx com o catião Cu (II) e 1,10-fenantrolina não alteraram a sua atividade biológica e o seu mecanismo de entrada na membrana bacteriana. No entanto, os valores de MIC para as estirpes W3110 e W3110  $\Delta C\Delta F$ , demonstraram uma alteração relevante já que a suscetibilidade ao complexo ternário não parece ser afetada pela ausência das porinas, contrariamente ao que sucede com o antibiótico livre. Em suma, as estirpes de *E. coli* testadas não apresentam uma suscetibilidade decrescida ao complexo  $[Cu:Lmx:Phe.NO_3].4H_2O$  comparativamente com a fluoroquinolona livre, no entanto, a complexação da Lmx, resulta em valores de MIC bastante mais baixos, quando se verifica a ausência simultânea de OmpF e OmpC. Estes resultados poderão sugerir alguma vantagem no uso deste metaloantibiótico em estirpes cujo mecanismo de resistência a antibióticos tenha por base alterações de permeabilidade.

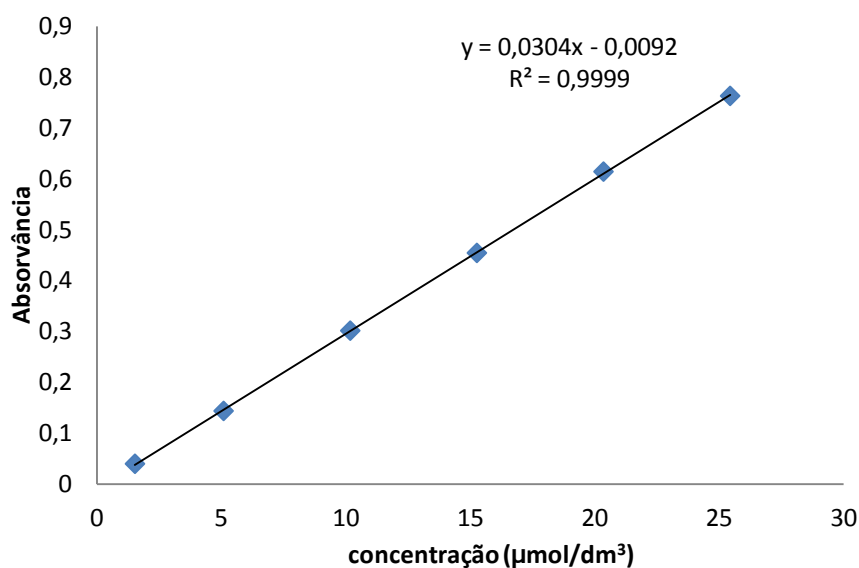
## 3.2 Estudos espectroscópicos

Todos estes estudos preliminares de UV-Vis visaram fornecer alguma informação relevante dos antibióticos em estudo (gamas de linearidade, concentrações de antibióticos ideais), bem como averiguar a fotodecomposição da Lmx e comparar com o complexo  $[Cu:Lmx:Phe.NO_3].4H_2O$

### 3.2.1 Leis de Lambert-Beer

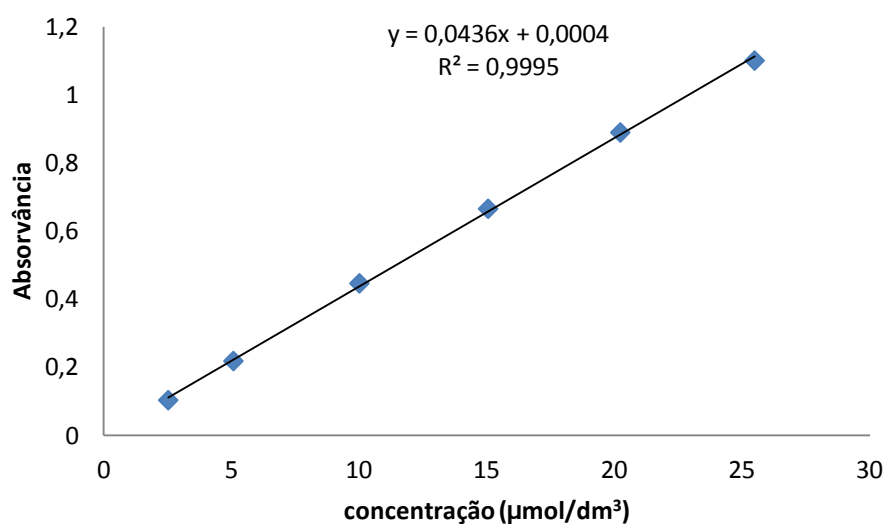
Estes estudos foram feitos com o intuito de inferir acerca da gama de linearidade da lei de Lambert-Beer para os compostos utilizados, sendo que serviram também como estudo preliminar para os estudos de fluorimetria, mais precisamente, para definir a gama de concentrações para as quais não se verifica efeito de filtro (que correspondam a absorvâncias que não ultrapassem os 0,1) - (ver Figuras 3.6 e 3.7)

## 3.2.1.1 Lomefloxacin



**Figura 3.6-** Representação gráfica  $A=f(c)$  para a Lmx com concentrações a partir de  $1,5 \mu\text{mol/dm}^3$  em HEPES  $10 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} \approx 7,4$ , a  $281 \text{ nm}$  (pico máximo para a Lmx)

## 3.2.1.2 Complexo ternário



**Figura 3.7-** Representação gráfica  $A=f(c)$  para a complexo ternário  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$  com concentrações a partir de  $1,5 \mu\text{mol/dm}^3$  em HEPES  $10 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} \approx 7,4$  a  $274 \text{ nm}$  (pico máximo para o complexo)

Os intervalos de concentração para os quais se verifica a lei de Lambert-Beer para a Lmx e [Cu:Lmx:Phe.NO<sub>3</sub>].4H<sub>2</sub>O apresentam-se na Tabela 3.10

**Tabela 3.10-** Intervalos de concentração onde se verifica a lei de Lambert-Beer para a Lmx e [Cu:Lmx:Phe.NO<sub>3</sub>].4H<sub>2</sub>O para espectrofotometria UV-Vis e espectrofluorimetria expressas em  $\mu\text{mol/dm}^3$

	[Lmx]	[Cu:Lmx:Phe.NO <sub>3</sub> ].4H <sub>2</sub> O
<b>Espectrofotometria UV-vis</b>	1,52-25,45	1,97-25,5
<b>Espectrofluorimetria</b>	1,52-2,98	1,97-2,14

Para os estudos fluorimétricos escolheram-se soluções de concentração  $\approx 2\mu\text{mol/dm}^3$

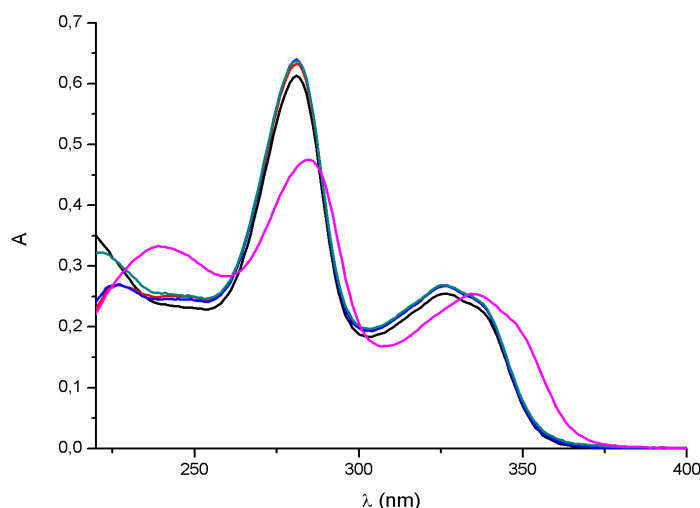
### 3.2.2 Influência da radiação UV nos espectros dos antibióticos.

#### 3.2.2.1 Espectroscopia UV-Vis

A fim de estudar a fotodecomposição da lomefloxacin e do respetivo complexo [Cu:Lmx:Phe.NO<sub>3</sub>].4H<sub>2</sub>O com radiação UV, traçaram-se os espectros UV-Vis ao longo do tempo (de hora em hora), sendo que nestas condições as soluções de antibiótico e respetivo complexo foram deixadas na bancada, enquanto que, antes de traçar o último espectro para os dois antibióticos, as respetivas soluções foi sujeita a 30 min de radiação UV.

##### 3.2.2.1.1 Lomefloxacin

O estudo espectroscópico UV-Vis para as soluções de Lmx está representado na Figura 3.8.



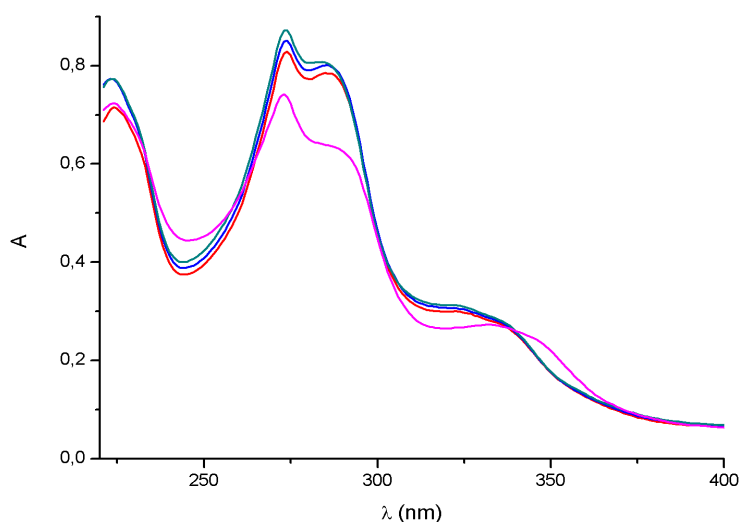
**Figura 3.8-** Representação gráfica de  $A=f(\lambda)$ , de 220 – 400 nm para soluções de Lmx de concentração  $\approx 20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$  em HEPES  $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ ,  $\text{pH} \approx 7,4$ , gráficos traçados na: 1ª hora — 2ª hora — 3ª hora — 4ª hora — radiação UV —

Com estes resultados, parece ser claro que a Lmx sofre decomposição com radiação UV, uma vez, que se verificam alterações significativas ao nível das bandas, nomeadamente alterações a nível do comprimento de onda e da respetiva absorvância, que pode sugerir que após a Lmx ser sujeita à radiação UV se forma(m) eventualmente outra/outras espécie(s). O comprimento de onda da banda de absorção para as soluções de Lmx surge aos 281 nm, (concordante com outros espectros realizados para esta fluoroquinolona [59] ), que corresponde a uma absorvância de 0,63, quando ela é sujeita à radiação UV a banda de absorção passa para os 285 nm correspondente a uma absorvância de 0,475, sendo que, também é visível uma banda aos 239 nm, que não é típica na Lmx.

#### 3.2.2.1.2 Complexo ternário

O estudo espectroscópico UV-Vis para as soluções de  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$  está representado na Figura 3.9.





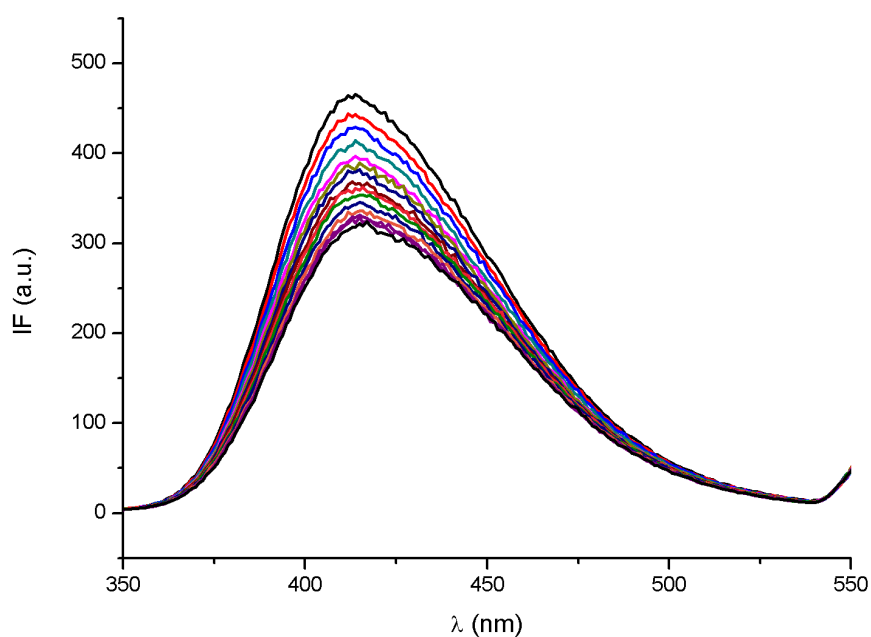
**Figura 3.9-** Representação gráfica de  $A=f(\lambda)$ , de 220 – 400 nm para soluções de  $[Cu:Lmx:Phe.NO_3].4H_2O \approx 20 \mu mol/dm^3$  em HEPES 10 mmol/dm<sup>3</sup>, pH $\approx$ 7,4, gráficos traçados na: 1ª hora — 2ª hora — 3ª hora — 4ª hora — radiação UV —

O gráfico para o complexo ternário sofre algumas mudanças quando sujeito a radiação UV, no entanto a banda onde o composto absorve dá-se sempre aos 274 nm (inclusive quando sujeito à radiação UV). Já para a absorvância nesta banda, verifica-se que decresce dos 0,83 para os 0,73. É visível também que há alteração ligeira na banda que surge  $\approx$  340 nm. Em suma, é visível uma mudança nos espectros UV-Vis do complexo, que poderá sugerir alguma fotodecomposição, mas que parece ser menor, quando comparada com a Lmx.

### 3.2.2.2 Fluorimetria

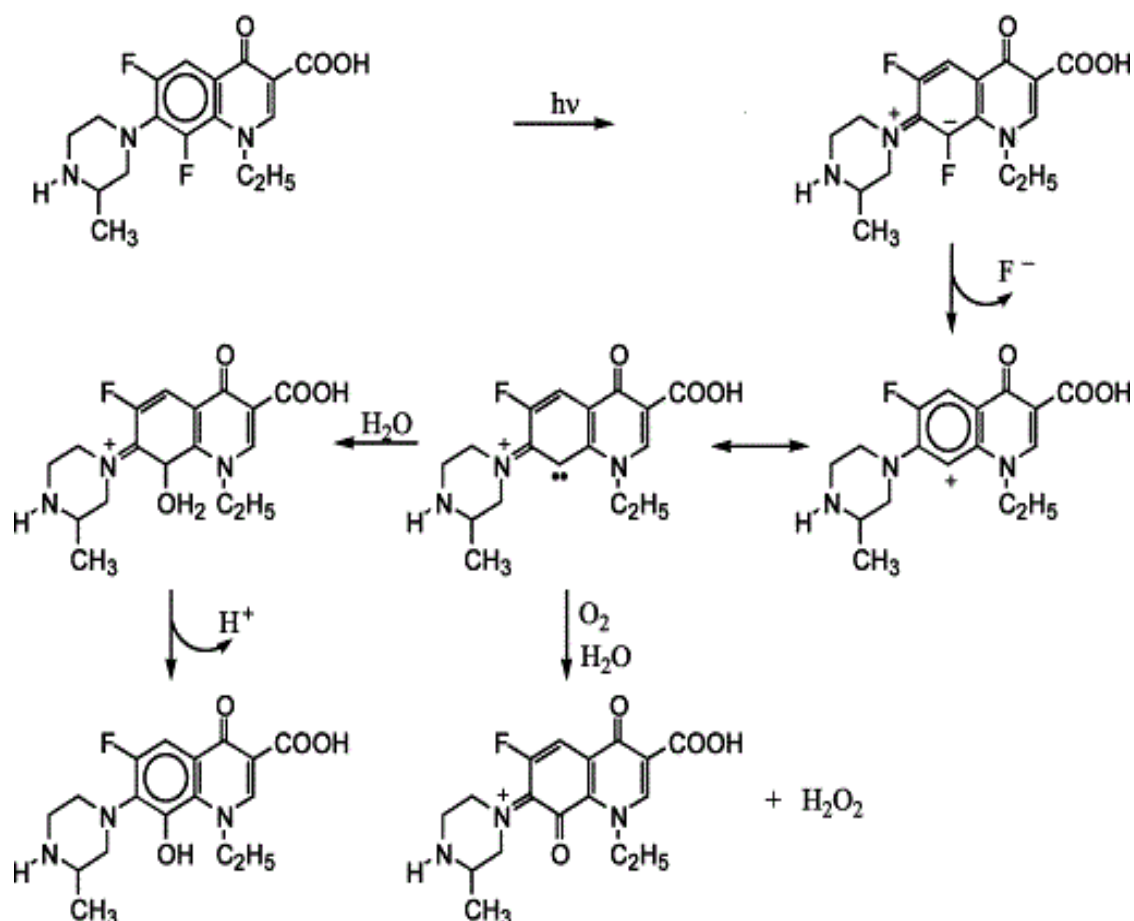
#### 3.2.2.2.1 Lomefloxacin

Na Figura 3.10, consta o espectro de fluorescência para a Lmx.



**Figura 3.10-** Representação gráfica de  $IF=f(\lambda)$  correspondente à excitação a 281 nm de Lmx,  $1.44 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$  em tampão HEPES  $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ ,  $\text{pH} \approx 7,4$ , com fendas de excitação a 10, correspondente a 15 ciclos seguidos (2 min entre cada ciclo).

O espectro parece ser esclarecedor em relação à instabilidade da Lmx com a radiação UV abordada em alguns trabalhos [1], o gráfico parece sugerir que a Lmx se decompõe, formando continuamente espécies diferentes e consequentemente espécies com fluorescências diferentes. A observação essencial é que a intensidade de fluorescência decresce de cerca de 450 a.u. para 300 a.u., ou seja, decresce cerca de 30% em relação à inicial. Na Figura 3.11 apresenta-se um mecanismo de fotodecomposição que parece estar de acordo com o observado.

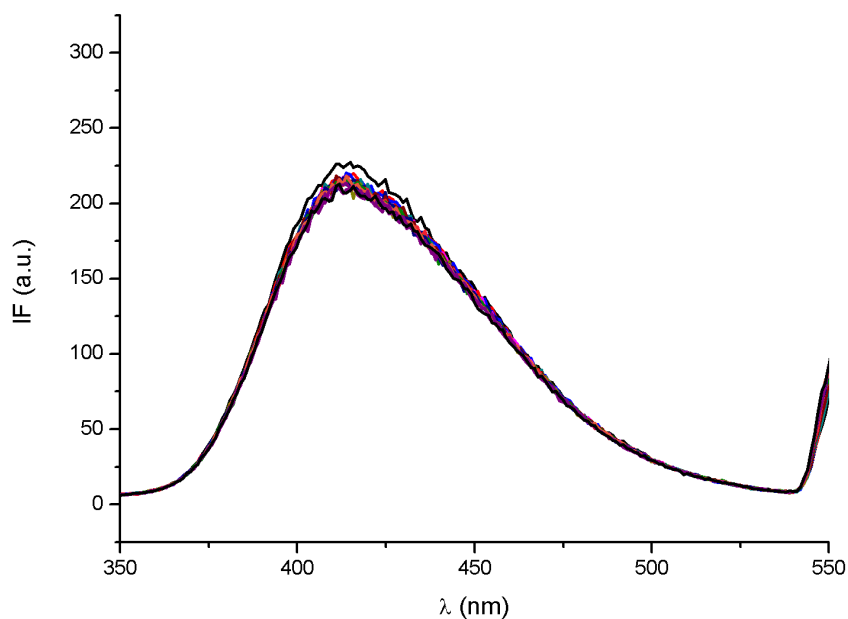


**Figura 3.11-** Possível mecanismo de fotodecomposição da Lmx (adaptado de [1])

Este mecanismo parece ser bastante plausível, pois é visível que algumas espécies perdem aromaticidade em relação à sua estrutura inicial, note-se que é esta aromaticidade que contém os grupos cromóforos, responsáveis pela fluorescência da estrutura, assim, a contínua diminuição na intensidade de fluorescência, não só sugere que se formam espécies com estruturas químicas diferentes, mas também que alterações na estrutura química da Lmx culminam numa perda de aromaticidade.

#### 3.2.2.2.2 Complexo ternário

Na Figura 3.12, consta o espectro de fluorescência para o complexo  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$



**Figura 3.12-** Representação gráfico da  $IF = f(\lambda)$  correspondente á excitação a 274 nm de  $[\text{Cu:Lmx:Phe.NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$   $1.904 \mu\text{mol/dm}^3$  em HEPES  $10 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} \approx 7,4$ , com fendas de excitação a 10, correspondente a 15 ciclos seguidos (2 min entre cada ciclo)

Por sua vez o espectro de fluorescência para o complexo ternário parece evidenciar que esta estabiliza, sendo que a variação do primeiro ciclo, para o último, é muito menor que a verificada para a Lmx. Em suma, em termos comparativos os resultados parecem sugerir um aumento significativo na estabilidade deste complexo, isto poderá significar, que não parece haver alteração significativa da aromaticidade dos ligandos, o que resulta numa intensidade de fluorescência muito mais constante e possivelmente numa menor fotodecomposição deste metaloantibiótico, que lhe pode facultar alguma vantagem, quando comparado com a Lmx, em termos de toxicidade.

## 4 Conclusão

Uma das principais consequências do uso indiscriminado dos antibióticos é a sua perda de atividade face a algumas infeções bacterianas. Uma das estratégias para combater essa resistência será o “design” de novos fármacos cuja atividade antimicrobiana seja substancialmente melhorada nas condições fisiológicas.

O estudo potenciométrico realizado permitiu verificar que tanto o complexo binário como o ternário se formam a pH fisiológico, sendo que são as espécies maioritárias a este pH, apesar de apenas o complexo ternário ser estável às concentrações e pH fisiológicos em simultâneo. Após a eleição do complexo ternário como potencial metaloantibiótico, a sua atividade biológica foi testada e comparada com a lomefloxacina livre. Para o efeito usaram-se estirpes mutantes de *E. coli* K12 com alterações ao nível das porinas e os resultados muito semelhantes para os dois compostos, sugerem que a complexação não inibe a atividade da fluoroquinolona. No entanto, os resultados sugerem também que a lomefloxacina e o seu complexo ternário com Cu (II) e 1,10-fenantrolina podem ter diferentes vias de influxo, o que poderá revelar-se uma mais-valia na luta contra microorganismos com fenótipos de resistência. São imprescindíveis mais estudos, nomeadamente com estirpes resistentes no entanto, os valores das MIC são promissores, tal como se tem verificado com complexos semelhantes com outras fluoroquinolonas.

O estudo espectroscópico da lomefloxacina pareceu confirmar a fotoinstabilidade/fototoxicidade da mesma, o mesmo estudo para o complexo ternário, deu indicações preliminares bastante positivas, pois os ensaios demonstraram, que o complexo ternário parece ser muito mais fotoestável, que poderá indicar a formação de muito menos espécies reativas e consequentemente uma redução dos problemas fototóxicos da lomefloxacina.

Em suma, todos os estudos realizados pareceram dar boas indicações, para o uso deste metaloantibiótico, em alternativa à lomefloxacina, ou seja, fica provada a existência e estabilidade às condições fisiológicas, indicações positivas na sua atividade antibacteriana, sendo que a elevada potência da lomefloxacina parece manter-se ou até eventualmente melhorar (a comprovar-se com mais estudos) e os estudos espectroscópicos, parecem indicar a melhoria substancial da fotoestabilidade.

Nunca será demais voltar a dizer, que serão imprescindíveis mais ensaios (microbiológicos, toxicidade etc) para efetivamente poder afirmar que este derivado complexado da lomefloxacina, pode constituir uma alternativa potenciada e com menos efeitos adversos.

# 5 Bibliografia

1. Park, H.R., T.H. Kim, and K.M. Bark, *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **37**(6): p. 443-460.
2. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, *Brock biology of microorganisms* 2000, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
3. Brighty, K.E. and T.D. Gootz, *Chapter 2 - Chemistry and Mechanism of Action of the Quinolone Antibacterials*, in *The Quinolones (Third Edition)*, T.A. Vincent, Editor 2000, Academic Press: San Diego. p. 33-97.
4. Leshner, G.Y., et al., *1,8-Naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents*. Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry, 1962. **91**: p. 1063-5.
5. Sable, D. and G.J. Murakawa, *Quinolones in dermatology*. Clinics in Dermatology, 2003. **21**(1): p. 56-63.
6. Sable, D. and G.J. Murakawa, *Quinolones in dermatology*. Disease-a-Month, 2004. **50**(7): p. 381-394.
7. Andriole, V.T., *The quinolones: Past, present, and future*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**: p. S113-S119.
8. Ball, P., *Chapter 1 - The Quinolones: History and Overview*, in *The Quinolones (Third Edition)*, T.A. Vincent, Editor 2000, Academic Press: San Diego. p. 1-31.
9. Lizondo, M., et al., *Physicochemical properties of enrofloxacin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **15**(12): p. 1845-1849.
10. Vazquez, J.L., et al., *Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **220**(1-2): p. 53-62.
11. Turel, I., N. Bukovec, and E. Farkas, *Complex formation between some metals and a quinolone family member (ciprofloxacin)*. Polyhedron, 1996. **15**(2): p. 269-275.
12. Behrens, N.B., G.M. Diaz, and D.M.L. Goodgame, *Metal complexes of the antibiotic nalidixic acid*. Inorganica Chimica Acta, 1986. **125**(1): p. 21-26.
13. Kawai, Y., K. Matsubayashi, and H. Hakusui, *Interaction of quinolones with metal cations in aqueous solution*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1996. **44**(8): p. 1425-1430.
14. Xiong, R.-G., et al., *An unprecedented 2-D rhombic molecular grid with a triangular cavity and a V4O6 cluster as the corner unit*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2001(6): p. 777-779.
15. Macias, B., et al., *Oxidative DNA damage of mixed copper(II) complexes with sulfonamides and 1,10-phenanthroline - Crystal structure of Cu(N-quinolin-8-yl-p-toluenesulfonamidate)(2)(1,10-phenanthroline)*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003. **96**(2-3): p. 367-374.



16. Zelenko, O., et al., *Chemical nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper. Isotopic probes of mechanism*. Inorganic Chemistry, 1998. **37**(9): p. 2198-2204.
17. Eliopoulos, G.M., et al., *In vitro activity of CI-934, a new quinolone antimicrobial, against gram-positive bacteria*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1986. **5**(4): p. 341-344.
18. Sonstein, S.A. and J. Dahlgren, *In vitro activity of lomefloxacin (SC 47111 or NY-198), a new quinolone antimicrobial, against clinical isolates of common pathogens*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1989. **12**(3, Supplement 1): p. 21-28.
19. de Vries, H. and G. van Henegouwen, *Photochemical decomposition of Lomefloxacin in vitro and in vivo*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2000. **58**(1): p. 6-12.
20. Klecak, G., F. Urbach, and H. Urwyler, *Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. **37**(3): p. 174-181.
21. Scholar, E.M., *Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents*. American Journal of Pharmaceutical Education, 2002. **66**(2): p. 164-172.
22. Wang, J.C., *DNA topoisomerases*. Annual Review of Biochemistry, 1985. **54**: p. 665-697.
23. Gootz, T.D. and K.E. Brighty, *Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects*. Medicinal Research Reviews, 1996. **16**(5): p. 433-486.
24. Alanis, A.J., *Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?* Archives of Medical Research, 2005. **36**(6): p. 697-705.
25. Martinez, M., P. McDermott, and R. Walker, *Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals*. The Veterinary Journal, 2006. **172**(1): p. 10-28.
26. Alvarez, A.I., et al., *Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(9): p. 3483-3493.
27. Tenover, F.C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. Am J Infect Control, 2006. **34**(5 Suppl 1): p. S3-10; discussion S64-73.
28. Li, X.Z., *Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005. **25**(6): p. 453-463.
29. Ena, J., et al., *Emergence of ciprofloxacin resistance in Escherichia coli isolates after widespread use of fluoroquinolones*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1998. **30**(2): p. 103-107.
30. Koebnik, R., K.P. Locher, and P. Van Gelder, *Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell*. Molecular Microbiology, 2000. **37**(2): p. 239-253.
31. Nikaido, H., *Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(6): p. 3905-3908.
32. Delcour, A.H., *Outer membrane permeability and antibiotic resistance*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2009. **1794**(5): p. 808-816.
33. Nikaido, H. and E.Y. Rosenberg, *Porin channels in Escherichia-Coli - studies with liposomes reconstituted from purified proteins*. Journal of Bacteriology, 1983. **153**(1): p. 241-252.
34. Pages, J.M., C.E. James, and M. Winterhalter, *The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(12): p. 893-903.

35. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003. **67**(4): p. 593-+.
36. Basle, A., et al., *Crystal structure of osmoporin OmpC from E-coli at 2.0 angstrom*. Journal of Molecular Biology, 2006. **362**(5): p. 933-942.
37. Jean-Marie Pagès, C.E.J., Mathias Winterhalter, *The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(12): p. 893-903.
38. Delcour, A.H., *Outer membrane permeability and antibiotic resistance*. Biochimica et Biophysica Acta, 2009. **1794**(5): p. 808-16.
39. Patrícia Neves, E.B., Paula Gameiro, Mathias Winterhalter, Baltazar de Castro, *Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF*. Biophysical Chemistry, 2005. **113**(2): p. 123-128.
40. John S. Chapman, N.G., *Routes of Quinolone Permeation in Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988. **32**(4): p. 438-442.
41. Nikaido H., T.D.G., *Penetration of Lipophilic Agents with Multiple Protonation Sites into Bacterial Cells: Tetracyclines and Fluoroquinolones as Examples*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993. **37**(7): p. 1393-1399.
42. Gran, G., *Determination of the equivalence point in potentiometric titrations .2*. Analyst, 1952. **77**(920): p. 661-671.
43. Gans, P., A. Sabatini, and A. Vacca, *Hyperquad computer-program suite*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2000. **219**: p. U763-U763.
44. Alderighi, L., et al., *Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species*. Coordination Chemistry Reviews, 1999. **184**(1): p. 311-318.
45. Chai, T.J. and J. Foulds, *Escherichia-Coli k-12 tolf mutants - alterations in protein-composition of outer membrane*. Journal of Bacteriology, 1977. **130**(2): p. 781-786.
46. Foulds, J. and T.J. Chai, *New major outer membrane-protein found in an escherichia-coli tolf mutant resistant to bacteriophage tuib*. Journal of Bacteriology, 1978. **133**(3): p. 1478-1483.
47. Foulds, J. and T.J. Chai, *Isolation and characterization of isogenic escherichia-coli strains with alterations in the level of one or more major outer-membrane proteins*. Canadian Journal of Microbiology, 1979. **25**(3): p. 423-427.
48. Bachmann, B.J., *Pedigrees of some mutant strains of Escherichia-Coli k-12*. Bacteriological Reviews, 1972. **36**(4): p. 525-557.
49. Wikler, M.A., Clinical, and I. Laboratory Standards, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : twentieth informational supplement* 2010, Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
50. McFarland, J., *The nephelometer - An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines*. Journal of the American Medical Association, 1907. **49**: p. 1176-1178.

51. Wikler, M.A., Clinical, and I. Laboratory Standards, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically : approved standard* 2009, Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
52. Turel, I., *The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**(1–2): p. 27-47.
53. Wallis, S.C., et al., *Interaction of norfloxacin with divalent and trivalent pharmaceutical cations. In vitro complexation and in vivo pharmacokinetic studies in the dog*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. **85**(8): p. 803-809.
54. Lopez-Gresa, M.P., et al., *Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin) - Spectroscopic and X-ray structural characterization. Antibacterial studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002. **92**(1): p. 65-74.
55. Gameiro, P., et al., *Solution studies on binary and ternary complexes of copper(II) with some fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline: Antimicrobial activity of ternary metalloantibiotics*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **334**(1-2): p. 129-136.
56. Li, R.C., D.E. Nix, and J.J. Schentag, *Interaction between ciprofloxacin and metal-cations - its influence on physicochemical characteristics and antibacterial activity*. Pharmaceutical Research, 1994. **11**(6): p. 917-920.
57. Saraiva, R., et al., *Solution and biological behaviour of enrofloxacin metalloantibiotics: A route to counteract bacterial resistance?* Journal of Inorganic Biochemistry, 2010. **104**(8): p. 843-850.
58. Ross, D.L. and C.M. Riley, *Dissociation and complexation of the fluoroquinolone antimicrobials - an update*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1994. **12**(10): p. 1325-1331.
59. Zhou, Y.Y., et al., *Spectrofluorimetric study on the inclusion interaction between lomefloxacin and p-sulfonated calix 4 arene and its analytical application*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2006. **64**(3): p. 748-756.